Aus dem Physiologischen Institut
Lehrstuhl für Klinische Physiologie
(Direktor: Prof. Dr. R. Kaufmann)
der Universität Düsseldorf

Heterokonjugate zwischen FITC-Albumin und Immunglobulinen

Darstellung, Reinigung und Nachweis der Immunaktivität

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Hans-Joachim Naurath

1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543909_0055

Aus dem Physiologischen Institut,
Lehrstuhl für Klinische Physiologie
(Direktor: Prof. Dr. R. Kaufmann)
der Universität Düsseldorf

Heterokonjugate zwischen FITC-Albumin und Immunglobulinen: Darstellung, Reinigung und Nachweis der Immunaktivität

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Hans-Joachim Naurath

1 9 8 3

"Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf"

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
gez.: Prof. Dr. H. Brüster

Referent
gez.: Prof. Dr. Moser
Korreferent
gez.: Prof. Dr. Bojar

Meinen Eltern

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Zusammenfassung 1

Abkürzungsverzeichnis, Vorveröffentlichungen 2

1. Einleitung

1.1 Fluorochromierte Antikörper und Antigene in der Cytochemie, Histochemie und im Fluorimmuno-Assay 3

1.2 Fluoreszenzverstärkung durch Kopplung von Antikörpern an Fluorochrom-Trägerproteine 13

2. Material und Methoden 18

3. Ergebnisse

3.1 Fluoreszenzträger 21

3.2 Chromatographische Reinigung von FITC-Albumin; Heterogenität der Kopplungsprodukte 22

3.3 Homobifunktionelle Kopplungsreagenzien 26

3.4 Heterobifunktionelle Kopplungsreagenzien 29

3.5 Kopplung von FITC-Albumin mit SPDP 34

3.6 Substitution von Antikörpern mit SPDP 35

3.7 Reduktion des PDP-FITC-Albumins mit Dithioerythrit; Erhaltung der Mercapto-propylgruppierung 40

3.8 Bildung des Heterokonjugats 40

3.9 Abtrennung des Heterokonjugats 43

3.10 Heterogenität der Konjugate 47

4. Diskussion 50

5. Literaturverzeichnis 58

Lebenslauf 67

Diese Arbeit wurde von Herrn Prof. Dr. J.G. Moser angeregt. Prof. Dr. Moser hat die experimentellen Arbeiten und die Abfassung des Manuskripts betreut. An den Voruntersuchungen war Herr Priv. Doz. Dr. R. Steiner wesentlich beteiligt. Einige der hier aufgeführten Analysen wurden gemeinsam mit meinem Kollegen Herrn cand. med. J. Steffgen durchgeführt, der an einem ähnlich gelagerten Problem arbeitet.

Herrn Prof. Dr. H. Bojar (Abt. Onkologische Biochemie) und den Herren Dr. Brandenburg und Dr. Saunders (Deutsches Wollforschungsinstitut, Aachen) danken wir für konstruktive Diskussionen. Die Firma Deutsche Pharmacia (Freiburg/Br.) hat uns durch Überlassung von Materialproben dankenswert unterstützt.

Die Arbeit wurde gefördert im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 30 -Cardiologie- der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Projekt D 4).

Z U S A M M E N F A S S U N G

Die geringe Fluoreszenzintensität konventionell fluorochromierter Antikörper (63) begrenzt die Nachweisempfindlichkeit für Makromoleküle niedriger Konzentrationen in der Immuncytochemie wie im Fluoro-Immuno-Assay (FIA). Erhöht man die Markierungsrate bei IgG-Antikörpern über ein molares Verhältnis $F/P_{molar} > 4$, so verliert der Antikörper seine Bindungsaktivität.

SCHLESSINGER et al. (54) haben zeigen können, daß man durch Kopplung stark fluorochromierter Trägermoleküle an Peptidhormone über bifunktionelle Reagenzien eine Fluoreszenzverstärkung ohne Verlust der biologischen Aktivität des Hormons erreicht.

Analog können wir zeigen, daß die biologische Aktivität von antihuman IgG nach Kopplung an FITC-Albumin über das heterobifunktionelle Reagenz SPDP erhalten bleibt. Aus dem maximalen Substitutionsgrad für die FITC-Albumine ($F/P_{molar} = 18$; 1-2 Mol SPDP/Mol) und der IgG-Antikörper (bis zu 7 Mol SPDP/Mol ohne Verlust der Antikörperaktivität) folgt theoretisch eine Fluoreszenzverstärkung bis zu 130 Mol FITC/Mol Antikörper.

Hier wird zunächst über die Darstellung, die Reinigung und die Charakterisierung von Konjugaten mit ~25 Mol FITC/Mol Antikörper berichtet.

Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen

DITC	p-Phenylen Diisothiocyanat (s. Abb. 9)
DTE	Dithioerythrit
DTNB	5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoesäure)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat (s. Abb. 7)
HXS	N-Hydroxysuccinimid (s. Abb. 3)
IgG	Immunglobulin G
P-2-T	Pyridin-2-thion (s. Abb. 13)
RIA	Radio-Immuno-Assay
RITC	Rhodaminisothiocyanat (s. Abb. 7)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SG 25	Sephadex G 25
SPDP	N-Succinimidyl-(dithiopyridyl-)propionat (s. Abb. 9)

Vorveröffentlichungen

Vorläufige Experimente, die zum Thema dieser Dissertation führten, wurden veröffentlicht.

NAURATH H.J., HETTWER H., MOSER J.G., SERVOS G., WAGNER B. (1980): Qualitative und quantitative Bestimmung von Antikörpern gegen myofibrilläre Proteine.
Acta Histochem., Suppl. XXI, 247-251 (43)

HETTWER H., JANSSEN H., MOSER J.G., NAURATH H.J., SERVOS U., WAGNER B. (1980): Bildung von Autoantikörpern und histopathologischer Verlauf bei experimentellen Immunmyopathien.
Verh. Anat. Ges. 73, 871-873 (30)

NAURATH H.J., MOSER J.G., HETTWER H., HARTMANN W. (1981): Strongly fluorescent conjugates between antibodies and FITC-labelled albumin.
Acta Anat. 111, 57 (44)

1. EINLEITUNG

1.1 Fluorochromierte Antikörper und Antigene in der Cytochemie, Histochemie und im Fluoro-Immuno-Assay (FIA)

Der qualitative und quantitative Nachweis von Antigen-Antikörper-Reaktionen ist selbst bei geringer Konzentration der Reaktanden grundsätzlich dann möglich, wenn einer der Reaktionspartner mit einer Markierung versehen wird. Aufgrund der hohen Spezifität und der Stöchiometrie der Antigen-Antikörper-Reaktionen wird bei bekannter Markierungsdichte eines der Reaktionspartner die Konzentration des Antigen-Antikörper-Komplexes dann meßbar, wenn Komplex und überschüssige Reaktanden voneinander getrennt werden können. Im einfachsten Falle, wie in der Immunhistochemie an fixierten Gewebeschnitten, kann diese Trennung durch geeignete Waschschritte erfolgen; ebenso bei Immunpräzipitaten etwa in der Immunelektrophorese oder in der Immundoppeldiffusion. Bei Immunreaktionen in Lösungen mit geringen Konzentrationen an Antigenen und Antikörpern wird eine Abtrennung von Immunkomplexen am sichersten dadurch erreicht, daß einer der Reaktionspartner an einen inerten Träger gebunden wird, auf dem die Reaktion abläuft und der dann leicht zu isolieren ist: man spricht von einem Immunoassay mit fester Phase.

Für die Markierung der Reaktionspartner haben sich Radioisotope, Enzyme und Fluorochrome durchgesetzt (22,27,65); in der elektronenmikroskopischen Histochemie und der Mikrobereichsanalyse finden zusätzlich Metalloproteide (z.B. Ferritin) und Edelmetallsole (z.B. Goldsol) als Marker Verwendung (29,36). Mit derartigen Markern werden sowohl Antikörper als auch Antigene unterschiedlichster chemischer Struktur kovalent gekoppelt oder zumindest so gebunden, daß im Verlauf der Immunreaktion und der Reinigung des Antigen-

Antikörper-Komplexes keine Änderung der Markierungsdichte erfolgen kann. Eine Kombination dieser Methoden erlaubt sowohl die Bestimmung der relativen Lagebeziehung von Zellstrukturkomponenten zueinander als auch die Bestimmung der relativen Mengen derartiger Komponenten innerhalb des gleichen Tests.

Uns interessiert hier besonders die Anwendung von Fluorochromen zur Markierung biologisch aktiver Makromoleküle, weil diese Form der Markierung - im Gegensatz zur Markierung mit Radioisotopen oder Enzymen - auch die Direktbeobachtung an lebenden Zellen oder Gewebekulturen erlaubt. Ein klassisches Beispiel ist die fluoreszenzmikroskopische Beobachtung des sogenannten "capping"-Phänomens an Lymphocyten, also die Konzentrierung von Immunglobulinrezeptoren an einem Zellpol. Ähnliche Beobachtungen gibt es inzwischen für Insulin-Rezeptoren und Rezeptoren für Epidermis-Wuchsfaktor, deren Dynamik, Konzentrierung, Internalisation und mögliche Rezirkulation direkt und mit hoher räumlicher Auflösung in vivo fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden konnte (8,28).

Überdies finden sich aber auch in allerletzter Zeit eine Reihe von Entwicklungen auf dem Gebiet der klinisch-chemischen Analyse, die - alternativ zu radioimmunologischen und enzymimmunologischen Testverfahren - fluoreszenzimmunologische Methoden zur Bestimmung von Antigenen, Antikörpern und freien Immunkomplexen verwenden. Man spricht hier von einem Fluoro-Immuno-Assay (FIA). In Tabelle 1 sind einige dieser Entwicklungen - ohne Anspruch auf Vollständigkeit - zusammengestellt. Zum besseren Verständnis des Vorhergesagten und der Tabelle wird die benutzte Methodik durch die Abbildungen 1 - 6 kurz beschrieben.

Die einfachste Anordnung einer Bestimmungsmethode für Immunkomplexe ist die d i r e k t e Immunreaktion (Abb. 1). Das Antigen wird hier an einen festen Träger adsorbiert oder kovalent gebunden und durch Gleichgewichtseinstellung mit einer definierten Konzentration an markiertem Antikörper auf dem Träger nachgewiesen. Im Bereich der Immunhistochemie gilt die direkte Immunreaktion als besonders spezifisch, ist aber von nur geringer Empfindlichkeit (1).

Die Empfindlichkeit und Anwendungsbreite dieser Nachweisreaktion läßt sich durch das Verfahren der i n d i r e k t e n Immunnachweismethoden erheblich steigern (Abb. 2). Hier reagiert das immobilisierte Antigen zunächst mit einem nicht markierten Antikörper, der dann weiter über zahlreiche Bindungsstellen mit einem markierten anti-Immunglobulin-Antikörper nachgewiesen wird. Der Erfolg ist eine wesentliche Verstärkung der Markierungsdichte und damit der Nachweisempfindlichkeit (31). Vorallem läßt sich dieses Verfahren zum Nachweis geringer Antikörpermengen in Serumproben, etwa von Autoimmunantikörpern benutzen, die sich an entsprechenden Antigenen auf dem Träger anreichern und so bis zur Nachweisbarkeit vorkonzentriert werden (60). Zugleich lassen sich die Autoantikörper nach ihrer Klassenzugehörigkeit charakterisieren.

Ausgehend von diesen Grundprinzipien lassen sich weitere Testanordnungen entwickeln, von denen nur einige hier relevante Variationen geschildert werden sollen.
Einerseits läßt sich anstelle des Antigens ein spezifischer Antikörper auf einem Träger immobilisieren, der auch aus Lösungen sehr geringer Konzentration zunächst das Antigen bindet und somit vorkonzentriert. Die so angereicherte Antigenmenge wird dann im zweiten Schritt mit markiertem antigenspezifischem Antikörper quantifiziert. Diese sog. " s a n d w i c h "-Anordnungen (Abb. 3) führen also wegen selektiver Anreicherung des Antigens zu erhöhter Empfindlichkeit des Tests (5,39). Eine Variation dieses Verfahrens, der sog. g e m i s c h t e Reaktionstyp läßt sich erfolgreich zum Nachweis von Immunkomplexen im Patientenserum heranziehen (Abb. 4): immobilisiertes Komplement C1q bindet zunächst die Immunkomplexe und konzentriert sie auf dem Träger; sodann wird die Immunglobulinkomponente des Komplexes mit markiertem Protein A aus Staphylococcus aureus quantitativ bestimmt (40).

Prinzipiell anders und mit sehr hoher Empfindlichkeit arbeiten Verdrängungs- und Rücktitrationsmethoden:

Bei der k o m p e t i t i v e n Methode (Abb. 5) konkurrieren nicht-markiertes Antigen einer Probe und markiertes Antigen des Bestimmungsansatzes um eine begrenzte Anzahl von Bindungsstellen immobilisierter Antikörper auf der Matrix. Je mehr unmarkiertes Antigen die Probe enthält, umso geringer wird die Markierungsdichte des isolierten Immunkomplexes.

Tabelle 1: Beispiele für die Anwendung von Fluoro-Immuno-Assays in der klinischen Diagnostik. Erklärung der Methodik siehe Abb. 1 - 6 und Text.

Nachzuweisendes Antigen / Hapten	Methodik	Untere Nachweis-grenze (µg/ml)	Zitat
Immunglobulin A	Rücktitration	6	(23)
Immunglobulin G		6	(59)
Immunglobulin M		6	(23)
Albumin		36	(59)
Monoklonales IgA		2	(19)
Monoklonales IgG		10	(19)
Properdin		0.3	(51)
Properdin Faktor B		3	(51)
Gentamycin	Kompetitiv	1	(58)
Theophyllin		2.5	(62)
Diphenylhydantoin		0.25	(11)
Anti-Myosin-Antikörper	Indirekte Immunfluoreszenz	0.1	(60)
Immunkomplexe bei bakt. Endokarditis	Gemischter Reaktionstyp	10	(40)

Diese vermindert sich annähernd exponentiell, wodurch diese Tests gerade im Bereich geringer Antigenkonzentrationen in der Probe besonders empfindlich werden (64). Nach diesem Prinzip arbeiten vor allem der Radioimmunoassay (RIA) und der Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) mit Nachweisempfindlichkeiten bis in den sub-Picomol-Bereich (22,64).

Der Vorteil der R ü c k t i t r a t i o n s - Methoden liegt vor allem in dem weiten Konzentrationsbereich, über den ein nicht-markiertes Antigen quantifiziert werden kann. Das Antigen wird durch einen markierten Antikörper im Überschuß als Immunkomplex gebunden und aus dem Reaktionsansatz eliminiert. Der verbliebene Antikörper-Überschuß wird dann durch immobilisiertes Antigen gebunden und bestimmt (Abb. 6). Ganz ähnlich wie bei der Komplementbindungsreaktion ist hier mit einfachen Mitteln ein Konzentrationsbereich von 3 - 4 Zehnerpotenzen schnell eingrenzbar und genau quantifizierbar.

Mit diesen Methoden, die sämtlich bereits aus der Radioimmunoassay- und Enzymimmunoassay-Technik bekannt sind, erreicht auch der Fluoro-Immuno-Assay prinzipiell ähnliche, oft aber geringere Nachweisempfindlichkeiten. Für eine große Zahl weiterer Testentwicklungen, vor allem auf dem Gebiet der Detektion und Quantifizierung von Antikörpern im Serum, liefern die bisherigen Publikationen lediglich methodisch bedingte Titerangaben, die mit eingeführten Verfahren notwendigerweise nur zum Teil übereinstimmen.

Prinzipiell ist die Entwicklung der FIA-Technik sehr zu begrüßen, da Fluoreszenzfarbstoffe zur Markierung von Antigenen und Antikörpern eine wesentlich höhere Stabilität als viele Radioisotope und Enzyme aufweisen, wodurch sich die Haltbarkeit der Testreagenzien wesentlich erhöht (24). Darüberhinaus entfällt das Entsorgungsproblem für radioaktive Abfälle aus radioimmunologischen Bestimmungen. Dennoch ergeben sich bei der Entwicklung derartiger Tests technische Probleme, die im folgenden andiskutiert werden sollen, und die in ganz gleicher Weise bei histologischen und cytologischen Fragestellungen auftreten.

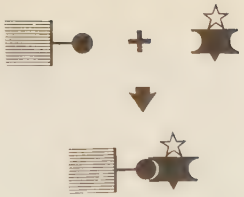


Abb. 1 Direkte Immunreaktion

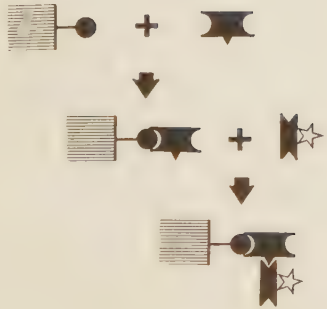


Abb. 2 Indirekte Immunreaktion

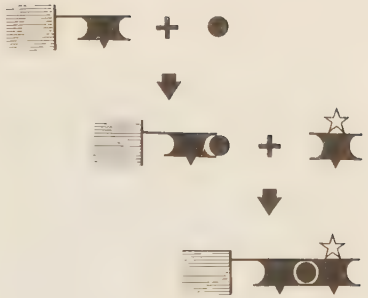


Abb. 3 Sandwich-Assay

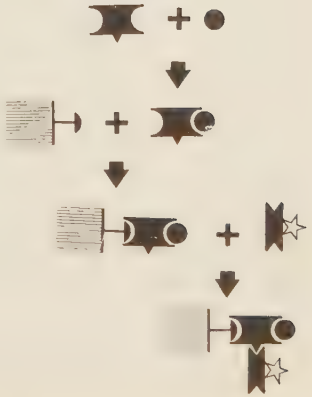


Abb. 4 Gemischter Reaktionstyp

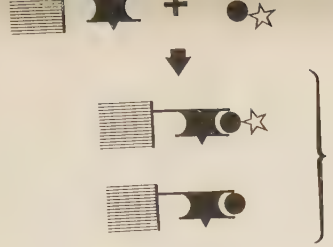


Abb. 5 Kompetitiver Reaktionstyp

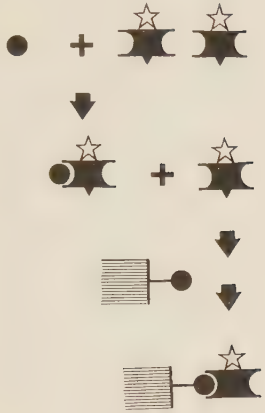
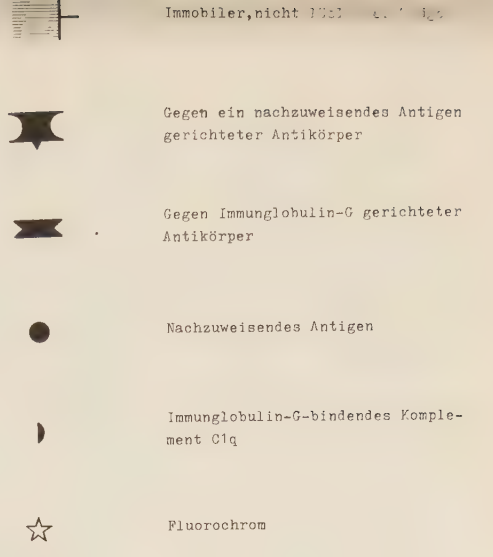


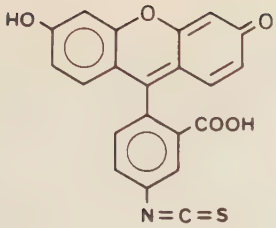
Abb. 6 Rücktitrationstechnik



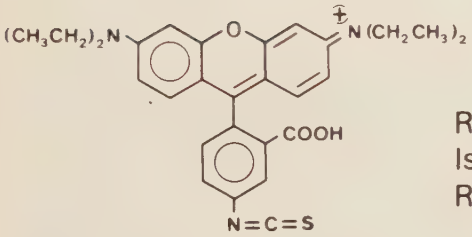
Zeichenerklärung zu nebenstehenden Abb. 1-6

An die zur Markierung benutzten Fluorochrome sind eine Reihe von Forderungen zu stellen: hohe Fluoreszenzausbeute, größtmöglicher Abstand zwischen den Maxima der Anregungs- und Emissionswellenlänge, stabile Kopplung zwischen Farbstoff und Trägermolekül, minimale Denaturierung des Trägermoleküls bei der Kopplungsreaktion. Weiter sollte der gekoppelte Fluoreszenzfarbstoff über längere Zeit ein stabiles Fluoreszenzverhalten zeigen (31).

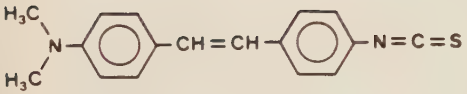
Eine Übersicht über die gebräuchlichsten Fluorochrome gibt Abb. 7. Das von COONS u. KAPLAN (15) verwendete Fluoresceinisocyanat (FIC) kam diesen Forderungen recht nahe, zeigte jedoch eine zu geringe chemische Stabilität. Außerdem erwies sich die Kopplungsreaktion als technisch schwierig und mit Denaturierungserscheinungen am Trägermolekül verbunden. Mit der Synthese des chemisch nahe verwandten Fluorescein-isothiocyanats (FITC) durch RIGGS et al. (50) konnten diese Nachteile jedoch weitgehend beseitigt werden. Das von McKINNEY et al. (34) isolierte FITC-Isomer I führte zu einer weiteren Verbesserung der Fluoreszenzausbeute. Unter optimalen Lagerungsbedingungen ist FITC bis zu zwei Jahren ohne wesentliche Veränderungen seiner Eigenschaften haltbar. Nur in Ausnahmefällen werden das Tetraaethylrhodamin-isothiocyanat (TRITC), Stilben-isothiocyanate oder Dansylchlorid zur Markierung von Antigenen und Antikörpern verwendet. In all diesen Fällen handelt es sich um Substanzen, deren Stabilität und vor allem deren Fluoreszenzausbeute geringer ist als die des Fluorescein-isothiocyanats. Jedoch weist TRITC-markiertes biologisches Material auf Grund einer anderen Anregungswellenlänge deutlich weniger Hintergrundfluoreszenz auf, als dies bei Markierung mit anderen Fluorochromen der Fall ist (7).



Fluorescein
Isothiocyanat
FITC
MG 389



Rhodamin B
Isothiocyanat
RITC
MG 536



4-Dimethylamino-
4'-Isocyanato-
Stilben
MG 280

Abb. 7 Darstellung der für Markierungszwecke am häufigsten benutzten Fluorochrome

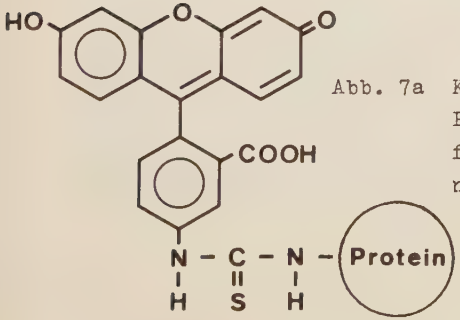


Abb. 7a Kovalente Kopplung zwischen Proteinen und Isothiocyanatfluorochromen vermittels einer Thiocarbamidbindung

Die Isothiocyanat-Fluorochrome der Abb. 7 werden unter Ausbildung einer Thiocarbamidbindung, vor allem über die ε-Aminogruppe des Lysins, kovalent an Proteine gebunden (31; siehe Abb. 7a). Die Substitution eines Proteinmoleküls mit FITC bewirkt eine Nettozunahme von 2 negativen Ladungen pro Molekül. Je höher ein Protein markiert wird, umso negativer wird seine Gesamtladung (41). Bereits aus histochemischen Untersuchungen war bekannt, daß wegen unspezifischer Anlagerung FITC-beladener Antikörper an stark basischen Gewebsteilen (z.B. nekrotischen Gewebsbereichen in Tumoren) hier eine spezifische Darstellung von bestimmten Antigenen prinzipiell unmöglich wird. Diese unspezifischen Anfärbungen, meist bedingt durch die Beladung mit verunreinigten Fluorochromen, bilden ein Hauptproblem bei der Entwicklung auch der Fluoroimmunoassay-Methoden (47). Die Möglichkeit der Beladung eines Antikörpermoleküls mit FITC wird durch die Ausbildung unspezifischer Bindungsreaktionen auf niedrige Markierungsraten beschränkt. Das molare Verhältnis von Fluoreszenzfarbstoff zu Protein F/P_{molar} sollte 3 : 1 nicht überschreiten (1), obschon im Fluoroimmunoassay Bedingungen gefunden werden können, die die unspezifische Fluoreszenz bei dieser Beladungsdichte weitgehend begrenzen (12).

Weiter ist bekannt, daß die direkte Substitution von Antikörpern mit mehr als 2 Mol FITC pro Mol Protein zur Denaturierung und Inaktivierung führen kann. Wir haben selbst bei Voruntersuchungen zur Entwicklung eines FIA's für Immunglobulin E sehr schlechte Erfahrungen mit FITC-übermarkierten anti-IgE-Antikörpern (IgG) machen müssen. Ein kommerziell angebotenes Präparat mit einer Markierungsdichte $F/P_{molar} = 9$ war biologisch völlig inaktiv. Mit einem konventionell markierten Antikörper der Markierungsdichte $F/P_{molar} = 3$ konnten wir dann IgE im Serum nach einer " s a n d w i c h " -Anordnung (entsprechend Abb. 3) zwar bestimmen; die Empfindlichkeit dieses Tests entsprach jedoch nur etwa der eines Tests

(Enzygnost^{R} IgE der Firma Behring) mit einer Nachweisgrenze von 10 IU IgE/l entsprechend ca. 25 pg/ml. Aus diesen Untersuchungen folgten Überlegungen, vermittels einer völlig anderen Markierungsmethodik Antikörper hoher Markierungsdichte zu entwickeln, die die Empfindlichkeit und Anwendungsbreite des Fluoroimmunoassays um mindestens eine Zehnerpotenz zu steigern erlauben sollten.

1.2 Fluoreszenzverstärkung durch Kopplung von Antikörpern an Fluorochrom-Trägerproteine

SHECHTER et al. (56) und SCHLESSINGER et al. (54) haben ein Modellsystem entwickelt, das vorsieht, zunächst Proteinmoleküle mit Fluorochromen zu beladen und sie dann in zweiter Reaktion über bifunktionelle Reagenzien an ein biologisch aktives Molekül zu koppeln. Auf diese Weise wurden hochfluoreszenzmarkierte Konjugate aus fluorochrom-markiertem Lactalbumin einerseits und Insulin oder Epidermis-Growth-Factor andererseits erhalten. Eine ähnliche Strategie wäre, einen Fluoreszenzträger mit hoher Markierungsdichte an ein Immunglobulin zu koppeln und das gewünschte Heterokonjugat nach Abtrennung freier Fluoreszenzträger, freien Immunglobulins und möglicher Homokonjugate zu isolieren. Eine Übersicht über dieses Verfahren gibt Abb. 8.

Das von SHECHTER et al. (56) verwendete Lactalbumin enthält lediglich 7 ε-Aminogruppen des Lysins als Bindungsstellen für Isothiocyanatfluorochrome. Besser erschien es uns, Humanserumalbumin als Fluoreszenzträger zu verwenden, das mit 56 ε-Aminogruppen (55) eine Vielzahl möglicher Bindungsstellen für Isothiocyanat-Fluorochrome aufweist. Außerdem zeigten Untersuchungen von SCHICK und SINGER (52), daß eine Kopplung

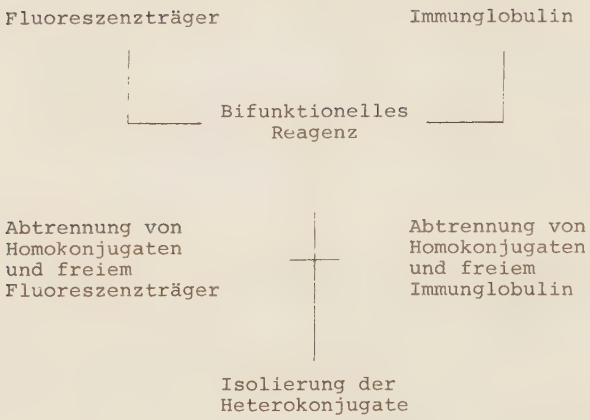
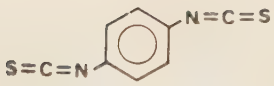


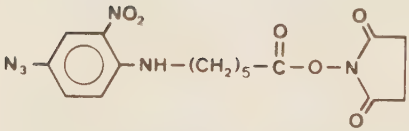
Abb. 8: Prinzip des Syntheseweges zur Darstellung eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers mit Hilfe eines bifunktionellen Reagenz.

zwischen Albumin und Immunglobulinen über das homobifunktionelle Reagenz DITC die immunologische Aktivität kaum beeinflußt, wenn nicht mehr als 2 Mol Albumin pro Mol Antikörper gekoppelt werden. Es waren Bedingungen zu ermitteln, unter denen eine optimale Substitution von Humanserumalbumin mit FITC eine hohe Fluoreszenzausbeute bei geringer Beeinflussung der Immunaktivität des Antikörpers herbeiführt.

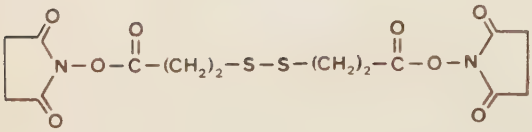
Für die Kopplungsreaktion mußte eine Reihe bifunktioneller Reagenzien auf Eignung untersucht werden. Prinzipiell dienen bifunktionelle Reagenzien zur Einführung reaktiver Gruppen in Makromoleküle, wodurch neue intra- und intermolekulare Bindungen geschaffen werden (61). Man unterscheidet homobifunktionelle Reagenzien mit zwei gleichen reaktiven Gruppen und heterobifunktionelle Reagenzien mit zwei unterschiedlichen reaktiven Gruppen (66). Um verschiedenartige Proteine zu Heterokonjugaten zu verknüpfen, bietet sich eine Zweischritt-Reaktion an, bei der zunächst eine der Komponenten mit dem bifunktionellen Reagenz umgesetzt wird, ehe die zweite Komponente zur Kopplung zugegeben wird. Der Vorteil dieser Technik gegenüber einer Einschritt-Reaktion besteht in der Möglichkeit, überschüssiges bifunktionelles Reagenz nach dem ersten Schritt zu entfernen, um so die Möglichkeit der Bildung von Homokonjugaten zu verringern (45). Eine weit verbesserte Steuerung des Reaktionsablaufs erlauben heterobifunktionelle Reagenzien, doch muß auch hier damit gerechnet werden, daß neben den erwünschten Heterokonjugaten polymere Homokonjugate entstehen (38). Darüberhinaus ist immer die Möglichkeit intramolekularer Verknüpfungen gegeben, die die Veränderung der Protein-Tertiärstruktur und damit eine mögliche Inaktivierung bedingen können (34). Abb. 9 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten bifunktionellen Reagenzien.



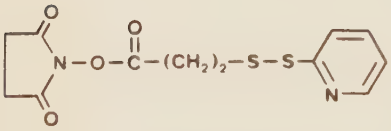
p-Phenyl Di-
isothiocyanat
DITC
MG 192



N-Succinimidyl-6-
(4'-Azido-2'-Nitro-
Phenyl-Amino)-
Hexanoat
MG 345



Dithiobis-
(Succinimidyl)-
Propionat
MG 404



N-Succinimidyl-
(Dithiopyridyl)-
Propionat = SPDP
MG 312

Abb. 9 Darstellung gebräuchlicher homo- und hetero-
bifunktioneller Reagenzien

Nach umfangreichen Voruntersuchungen über die Verwendbarkeit konventionell fluorochromierter Antikörper im direkten und indirekten Fluoroimmunoassay (siehe Abb. 1 und 2) ist das Ziel d i e s e r A r b e i t die Synthese hochfluorochromierter Antikörper-Konjugate in der Absicht, hierdurch die Bestimmungsempfindlichkeit des Fluoroimmunoassays zu verbessern. Auch für die Immun-Histochemie und die Immun-Cytochemie wären solche Antikörper gerade deswegen von Bedeutung, weil sie im Gegensatz zu radiomarkierten und enzymmarkierten Antikörpern eine Anwendung an lebenden Geweben und Zellen erlauben sollten. Vor allem könnten "fluoreszenzverstärkte" Antikörper im Sinne der direkten Immunmethode der Abb. 1 angewandt werden, ohne daß zur Fluoreszenzverstärkung auf die indirekte Immunmethode der Abb. 2, die immer eine verstärkte Hintergrund-Fluoreszenz mit sich bringt, zurückgegriffen werden müßte.

2. M A T E R I A L UND M E T H O D E N

Lösungen wurden grundsätzlich unter Verwendung von p.A.-Chemikalien der Firma Merck in quarzbidestilliertem Wasser oder p.A.-Lösungsmitteln angesetzt. Weitere Chemikalien wurden durch folgende Hersteller bezogen:

Firma Behring, Marburg	- Humanalbumin
Dt. Pharmacia, Freiburg/Br.	- SPDP Sephadex Sepharose und Derivate Cytodex 1 Sephacryl 200
Firma LKB, München	- Antikörper
Firma Medac, Hamburg	- Antikörper
Firma Miles Yeda, Frankfurt/M.	- Antikörper
Firma Pierce, Rotterdam	- Bifunktionelle Reagenzien (außer SPDP)
Firma Serva, Heidelberg	- FITC I DTNB Agarose und eine Reihe weiterer Ionenaustauscher (siehe S. 24)

Humanplasma-Konserven wurden für gelegentliche Vorversuche von der Blutspender-Zentrale der Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Instrumentell wurde im wesentlichen mit dem Shimadzu UV 200 Spektrophotometer gearbeitet; Fraktionierungen wurden unter Verwendung eines Uvicord 1 und eines Fraktionssammlers der Firma LKB durchgeführt.

Proteinbestimmungen wurden grundsätzlich mit einem Farbstoff-Bindungstest der Firma Biorad (München) ausgeführt,

der auf einer Extinktionsänderung von Coomassie Brilliant Blue G 250 bei 595 nm in Gegenwart von Proteinen beruht (6). Die bei dieser Wellenlänge gemessenen Extinktionsänderungen sind unterschiedlich für verschiedene Proteinklassen und mußten daher für Albumine und Gammaglobuline durch eigene Eichkurven ausgewertet werden. Jeweils 50 µl einer geeigneten Proteinlösung mit 0.1 bis 1.5 mg Protein pro ml wurden pro Analyse benötigt. Der Einfluß von Fluorescein-isothiocyanat auf die Meßergebnisse war relativ gering, wurde aber in einer eigenen Versuchsreihe zusätzlich bestimmt. Bei jeder Meßreihe wurden Kontrollproben mitanalysiert, wobei das Ergebnis in eine statistische Qualitätskontrolle für die Bestimmung einfloß. Die ermittelten relativen Standardabweichungen betrugen für die Albumin-Bestimmung bei 0.5 mg pro ml rund 4% (ΔE_{595} = 0.378 ± 0.014) und für die Gammaglobulin-Bestimmung bei 0.5 mg pro ml rund 3% (ΔE_{595} = 0.198 ± 0.006) für jeweils 20 Messungen. Alle weiteren Messungen bewegten sich im ± 2 s-Bereich der angegebenen Werte und waren somit unter Kontrolle. Im einzelnen wurden für den untersuchten Konzentrationsbereich die Eichkurven der Abb. 10 erhalten.

Zur Bestimmung von Sulfhydrylgruppen wurde das Verfahren nach Ellmann (21) unter Verwendung von Dithionitrobenzoesäure (DTNB) der Vorschrift entsprechend benutzt.

Gesamtglobuline aus Humanplasmakonserven oder Kaninchenseren wurden durch Fällung mit Ammoniumsulfat zwischen 30 und 55% Sättigung erhalten. IgG-Fraktionen wurden aus den Gesamtglobulinen durch Chromatographie an DEAE-Sephacel nach Mollison (42) dargestellt. Nach verschiedenen Verfahren der Literatur (4,16,20,48) wurden IgG-Fraktionen an cyanbromidaktivierte Sepharose für Zwecke der Immunabsorptionschromatographie kovalent gekoppelt. FITC - gekoppelte

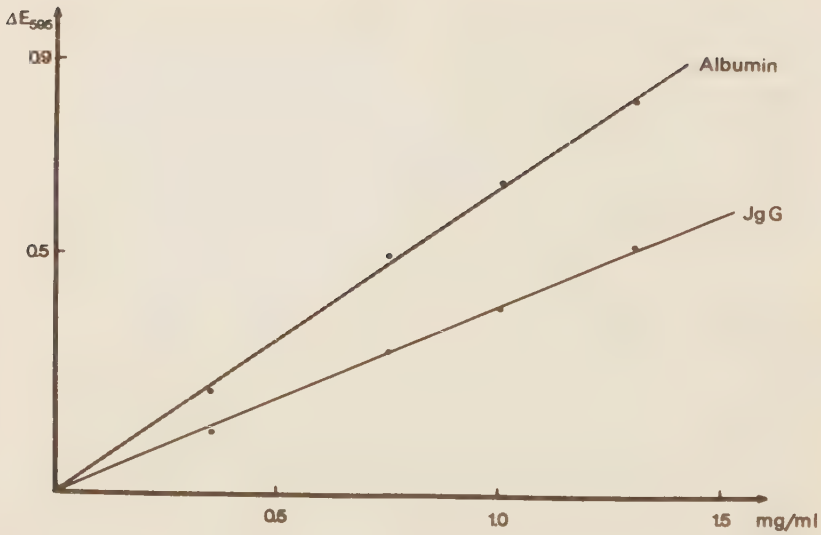


Abb. 10: Eichkurven zur Proteinbestimmung von Albuminen und Gammaglobulinen mit dem Farbstoffbindungstest (Coomassie Blue G 250).

IgG-Fraktionen und Humanserumalbumine wurden durch Direktmarkierung nach Wood et al. (63) dargestellt, wobei diese Methode im Laufe der Untersuchungen mehrfach modifiziert wurde (siehe Ergebnisse).

3. ERGEBNISSE

3.1 Fluoreszenzträger

Die bereits beschriebene Begrenzung der Fluoreszenz-Markierung von Lactalbumin auf 7 Mol pro Mol ließ zunächst fragen, ob nicht wesentlich dichtere Fluoreszenz-Markierungen mit Polypeptiden höheren Lysingehaltes zu erreichen seien. Einige Vorversuche mit Poly-L-Lysin (Molekulargewicht 7000-30 000) zeigten allerdings, daß bereits gering mit FITC substituierte Proben sofort unlöslich wurden. Dasselbe gilt übrigens für Rhodaminkonjugate dieser Substanz. Eine zusätzliche Schwierigkeit bot die Bestimmung des Substitutionsgrades von Poly-L-Lysin wegen dessen verschwindend geringer UV-Absorption, was eine einfache Bestimmung durch Spektrenvergleich unmöglich macht.

Einfacher erschien daher die Fluoreszenz-Markierung eines Proteins mit höherem Lysingehalt, wozu wir als Modellsubstanz Humanserumalbumin benutzen, das mit 56 seitenkettenterminalen ε-Aminogruppen Aussicht auf eine hohe Markierungsdichte bot (12,55).

In Abwandlung der Methode von WOOD et al. (63) wurden hochfluoreszenzmarkierte Albumine nach folgendem Verfahren erhalten:

Humanalbumin wird in einer Konzentration von 10 mg/ml in 0.1 M NaCl - 0.1 M Na_2HPO_4 (eingestellt auf pH 7.5) - im folgenden als Reaktionspuffer bezeichnet - gelöst.

Der pH wird bei Reaktionsbeginn auf 9.0 eingestellt und 100-500 µg Fluoresceinisothiocyanat (FITC)/mg Protein zugesetzt. Während einer Stunde wird der pH auf 9 - 9.5 gehalten und der Ansatz mit einem Magnetrührer gerührt. Die Reaktionszeit darf nicht wesentlich überschritten werden, da sonst die Gefahr besteht, daß übermarkierte FITC-Albumin-Konjugate entstehen, welche ausfallen.

Der Ansatz wird über Nacht im Kühlraum (0 - 4°C) gegen den Reaktionspuffer dialysiert. Der Puffer wird solange gewechselt, bis das Dialysat nahezu farblos ist.

Bei diesem Vorgehen zeigte sich, daß keinesfalls alle vorhandenen ε-Aminogruppen des Lysins einer Substitution mit FITC zugänglich sind (Tab. 2). Unter den oben gegebenen Bedingungen war die maximal erreichte Markierungsdichte $F/P_{molar} = 12$ bei der höchsten verwendeten FITC-Konzentration.

Für die Markierungsfunktion des substituierten Albumins erschien dessen biologische Integrität irrelevant. So versuchten wir, durch reversible Denaturierung und Auffaltung der Tertiärstruktur weitere Lysinreste einer Markierung mit FITC zugänglich zu machen. Hierzu wurden das nicht-ionische Detergenz Triton X 100, Natriumdodecylsulfat und Guanidinhydrochlorid untersucht. Wie Tabelle 2 zeigt, ergeben sich in Gegenwart dieser Substanzen wesentlich höhere Markierungsraten, im besten Fall unter 4 M Guanidinhydrochlorid eine Markierungsdichte $F/P_{molar} = 30$.

3.2 Chromatographische Reinigung von FITC-Albumin. Heterogenität der Kopplungsprodukte

Bereits früher im Zusammenhang mit Vorversuchen dargestellte Globulin-FITC-Direkt-Konjugate zeigten bei der Chromatographie an basischen Ionenaustauschern (DEAE-Cellulose, DEAE-Sephacel, DEAE-Sephadex) eine große Zahl von Fraktionen, die auf unterschiedlicher Substitution mit dem Fluoreszenzfarbstoff beruhten. Um eine gewisse Homogenität der für Kopplungsreaktionen einsetzbaren Albuminkonjugate zu erreichen und

Tabelle 2: Kopplung von FITC an Humanserumalbumin modifiziert nach Wood et al. (63). Durch Vorbehandlung des Humanserumalbumins kann die Markierungsrate erheblich gesteigert werden.

Vorbehandlung von Humanserumalbumin im Reaktionssatz	Anzahl der Versuche	Pro 100 mg Humanserumalbumin eingesetztes FITC (mg)	Maximal erreichtes molares Verhältnis von FITC zu Albumin (F/P)
—	4	10	5
—	2	30	8
—	2	50	12
1% Triton X 100	5	50	16
1% Natriumdodecylsulfat (SDS)	5	50	22
4 M Guanidinhydrochlorid	9	50	30

damit eine mögliche unspezifische Adsorption besser unter Kontrolle zu bringen, versuchten wir, die Albumin-Reaktionsprodukte entsprechend zu chromatographieren.

Hierbei zeigten sich erhebliche Schwierigkeiten: in aller Regel werden die FITC-Albumine an basischen Ionenaustauschern üblicher Kapazitäten nahezu irreversibel adsorbiert und sind auch bei sehr hohen Ionenstärken nicht vom Austauscher abtrennbar (7); an sauren Ionenaustauschern andererseits ergibt sich keinerlei Trennung in Fraktionen unterschiedlichen Substitutionsgrades. Folgende Ionenaustauscher wurden erfolglos für diese Versuche eingesetzt:

Ionenaustauscher	Anzahl der Versuche
AE-Sephadex	1
DEAE-Sephadex	6
CM-Sephadex	2
SP-Sephadex	2
AE-Cellulose	1
DEAE-Cellulose	4
CM-Cellulose	2
Ecteola-Cellulose	1
Hydroxylapatit	3

Es gelang schließlich, durch Anwendung des sehr niedrig DEAE-substituierten Ionenaustauschers Cytodex 1 eine Auftrennung der Konjugate bei stufenweiser Elution mit 0.7 - 1.2 - 1.7 M KCl in Reaktionspuffer zu erreichen (Abb. 11). Auch hier verbleiben sehr hoch substituierte Produkte in der Säule, deren Füllmaterial nach der Elution verworfen wird.

Die Auftrennung der FITC-Albumine an Cytodex 1 bietet den weiteren Vorteil, daß die eluierbaren Fraktionen keine unspezifische Adsorption an Gelfiltrationsmedien zeigen, wie sie später für die Auftrennung von Protein-Protein-Konjugaten

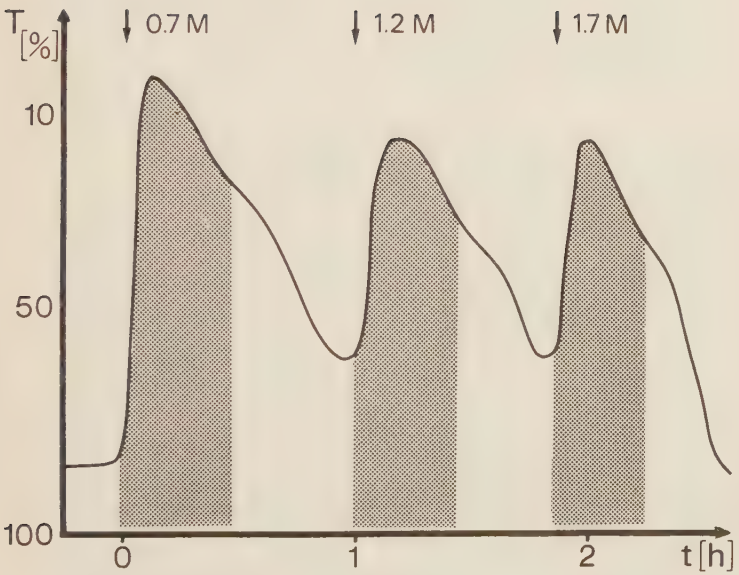


Abb. 11: Ionenaustauschchromatogrphie von hochmarkierten FITC-Albuminkonjugaten an Cytodex 1. Zur Methodik siehe Text. Säule in 0.1 M NaCl - 0.1 M Na_2HPO_4, pH 7.5.

verwendet werden (siehe S.43). Insbesondere erfolgt keine Adsorption an dem häufig verwendeten Sephadex G 25, das zur Abtrennung niedermolekularer Substanzen benutzt wurde.

Für die weiteren Experimente wurden, wenn nicht anders angegeben, Fraktionen mit einer Markierungsdichte $F/P_{molar} = 15 - 18$ benutzt. Diese Fraktionen wurden konzentriert, gegen den Reaktionspuffer dialysiert, mit 20 mM NaN_3 versetzt und für längerfristige Aufbewahrung bei $-18^{o}C$ eingefroren.

3.3 Homobifunktionelle Kopplungsreagenzien

Unter den beiden in Abb. 9 (S.16) dargestellten homobifunktionellen Reagenzien, p-Phenylen-Diisothiocyanat (DITC) und Dithiobis-Succinimidyl-Propionat, bietet das zweite den Vorteil, den Erfolg einer Protein-Protein-Konjugation nach Reduktion der Disulfidbrücke chromatographisch nachweisen zu können. Außerdem läßt sich der Ablauf einer Kopplungsreaktion durch die Zunahme der Absorption bei 260nm (Freisetzung von N-Hydroxysuccinimid) quantitativ verfolgen. Alternativ kann der Erfolg der Kopplungsreaktion durch Elektrophorese kontrolliert werden (37). Ankopplung von DITC an Proteine läßt sich nach Gelfiltration über Reaktion mit einer markierten Aminosäure (z.B. ^{3}H-Glycin, ^{3}H-Lysin) feststellen. Hierzu sind im Verlaufe dieser Arbeit insgesamt 18 erfolglose Experimente durchgeführt worden.

Für Vorexperimente zur Erarbeitung der Protein-Protein-Kopplungstechnik wurde das homobifunktionelle Reagenz DITC verwendet. Das Vorgehen entsprach zunächst weitgehend den Angaben von SCHICK u. SINGER (52). Erste Schwierigkeiten traten

bereits durch die mangelhafte Löslichkeit der Substanz in wässrigen Proteinlösungen auf (45). DITC-Lösungen wurden in der Konzentration von 10 mg/ml in Dimethylformamid hergestellt und in kleinen Portionen von 10 - 50 µl zu 5 - 10 ml FITC-Albumin gegeben, wobei die Mischung am Magnetrührer stark gerührt wurde. Nach 30 Minuten Reaktionszeit war der Ansatz stark getrübt. Dimethylformamid führt selbst nicht zur Ausfällung des Proteins. Es ließ sich eindeutig zeigen, daß das DITC die Trübung verursacht. Als weitere Lösungsvermittler wurdenÄthylenglycoldiäthyläther und Äthylenglycolmonomethyläther versucht; die hier benötigten hohen Konzentrationen an organischen Lösungsmitteln fällen das Protein selbst bei geringer Konzentration (etwa 1 mg/ml) aus. Es gelang schließlich, durch Zusatz von N-Methylmorpholin im Verhältnis 1 : 1 (pH = 8.5) zu einer homogenen Lösung zu gelangen, deren hochmolekularer Anteil nach der Inkubation zunächst über Gelfiltration an Sephadex G 25 isoliert wurde (37).

Um zu prüfen, ob unter den genannten Bedingungen freie reaktive Isothiocyanatgruppen an Albumin erhalten werden, wurde der isolierten hochmolekularen Fraktion ^{3}H-Glycin (0.1 mCi in einer Endkonzentration von 1.2 µM) zugesetzt und nach Reaktion über Nacht abermals eine Gelfiltration an Sephadex G 25 durchgeführt. Hierzu wurde die hochmolekulare Fraktion zusätzlich mit Albumin markiert. Da trotz der hohen Markierung Radioaktivität ausschließlich in der niedermolekularen Fraktion gefunden wurde, muß geschlossen werden, daß unter allen hier untersuchten Bedingungen keine freien Isothiocyanatgruppen in Albumin eingeführt werden, und demzufolge eine Protein-Protein-Kopplung nicht zustande kommen kann, obwohl genau nach den Vorschriften der genannten Autoren verfahren wurde.

Die Frage einer Erhaltung von Antikörperaktivitäten nach Reaktion mit DITC wurde unter den gegebenen Umständen garnicht erst geprüft.

Tabelle 3: Reaktion von Humanserumalbumin und FITC-markiertem Humanserumalbumin mit unterschiedlichen Konzentrationen an SPDP. Abhängigkeit des erzielten Substitutionsgrades von der Höhe des molaren F/P-Verhältnisses (Verf. siehe S.35).

Molares Verhältnis FITC zu Humanserumalbumin (F/P_{molar})	Vorgegebener molarer SPDP-Überschuß	Erreichter Substitutionsgrad	
		Mol PDP/ Mol Protein	in % des vorgegebenen SPDP-Überschusses
0	1.5	1.4	93
	3.0	2.6	87
	6.0	5.2	86
	15.0	13.0	86
8	3.1	1.9	61
	6.2	3.8	61
	15.4	9.8	63
12	3.0	1.7	57
18	2.9	1.5	52
	5.7	2.9	51
	28.0	13.0	46

Der wesentlichste Nachteil der homobifunktionellen Reagenzien liegt eben darin, daß immer Homokonjugate in Proteinlösungen gebildet werden, die nach Ablauf der Reaktion einen komplizierten Nachreinigungsprozess erfordern, sofern überhaupt Bindungsbedingungen gefunden werden können. Daher wurden weitere Untersuchungen für unseren Zweck eingestellt.

3.4 Heterobifunktionelle Kopplungsreagenzien

Die heterobifunktionellen Reagenzien erlauben eine befriedigende Reaktionssteuerung, wie bereits einleitend begründet. Mit N-Succinimidyl-6-(4'-Azido-2'-Nitrophenylamino)-Hexanoat wurden zwei Versuche zur Kopplung an FITC-Albumin durchgeführt. Hierbei hielten wir uns an die von LOMANT u. FAIRBANKS (38) angegebenen Reaktionsbedingungen für die Aminolyse des Succinimidylesters.

2 mg Albumin wurden unter Lichtabschluß mit 0.5 mg des genannten Reagenz in Dimethylformamid und in 0.1 M Phosphatpuffer bei pH 7.3 für 30 Minuten im Eisbad behandelt. Danach wurden 0.1 mCi ^{3}H-Glycin (entsprechend 4 µM) zugegeben. Der Ansatz war bereits unmittelbar nach der Reaktion dunkelrot gefärbt. Nach 2 Minuten Belichtung im UV bei 360 nm wurde eine Probe des Ansatzes über Sephadex G 25 chromatographiert. Im Albuminpeak wurde keine Radioaktivität gefunden. Ganz offenbar war unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen hier keine Kopplung zu erreichen. Möglicherweise war auch das Reagenz nicht mehr intakt. Von einer Weiterführung dieser Experimente mußte auch wegen der sehr hohen Kosten für das Reagenz Abstand genommen werden.

Sehr viel stabiler und in allen Reaktionsschritten analytisch verfolgbar ist die Verwendung des heterobifunktionellen Reagenz N-Succinimidyl-(Dithiopyridyl)-Propionat (SPDP). Die Aminolyse des Succinimidylesters geht allerdings an den gleichen Bindungsstellen in einem Proteinmolekül vor sich wie die Ankopplung des Fluoreszenzmarkers FITC, also an ε-Aminogruppen des Lysins, wie sich zeigen läßt (Tab. 3; zum Reaktions-

mechanismus siehe Abb. 12). Die gewünschte Substitution ist durch den verwendeten Überschuß an Reagenz steuerbar. Hierzu läßt sich die Konzentration an intaktem Reagenz in einfacher Weise einmal durch Spaltung der Disulfidbrücke mit Dithioerythrit und Messung des freigesetzten Pyridin-2-thions bei 343 nm und andererseits durch alkalische Hydrolyse des N-Succinimidylesters und Messung des freigesetzten N-Hydroxysuccinimids bei 260 nm bestimmen. Da die Estergruppierung stark feuchtigkeitsempfindlich ist, ist die 2. Bestimmung entscheidend für die Reaktivität des Reagenz. Darüberhinaus läßt sich durch Dünnschichtchromatographie leicht entscheiden, wieweit eine Reagenzcharge noch intakt ist und für die folgenden Experimente benutzt werden kann (Abb. 13a; zur Methodik siehe die Abbildungslegende). Nach CARLSSON et al. (10) wird die Substitution getrennt für die beiden Kopplungspartner eines Protein-Protein-Konjugats vorgenommen. Der Reaktionsablauf kann durch Messung bei 260 nm (Freisetzung von N-Hydroxysuccinimid) kinetisch verfolgt werden. Nach Abschluß der Reaktion kann zusätzlich der Substitutionsgrad nach Reduktion mit Dithioerythrit bei Spaltung der Disulfidbrücke über die Absorption von Pyridin-2-thion bei 343 nm bestimmt werden (Abb. 13b,c). Für die Kopplung zwischen Proteinen wird schließlich einer der Reaktionspartner reduziert und durch Gelfiltration vorgereinigt. Die freien SH-Gruppen dieses Partners reagieren gezielt mit den Pyridin-dithiopropionamido-Gruppen des anderen Reaktionspartners unter sehr schonenden Bedingungen (pH 7.5 über 20 Stunden bei Zimmertemperatur), wobei so gut wie keine Homokonjugate entstehen. Diese Reaktion ist wiederum spektrometrisch bei 343 nm kinetisch verfolgbar (Abb. 13c), und der Beweis für die Bildung von Heterokonjugaten kann analytisch durch Trennung der Konjugatpartner unter stark reduzierenden Bedingungen (DTE) vorgenommen werden.

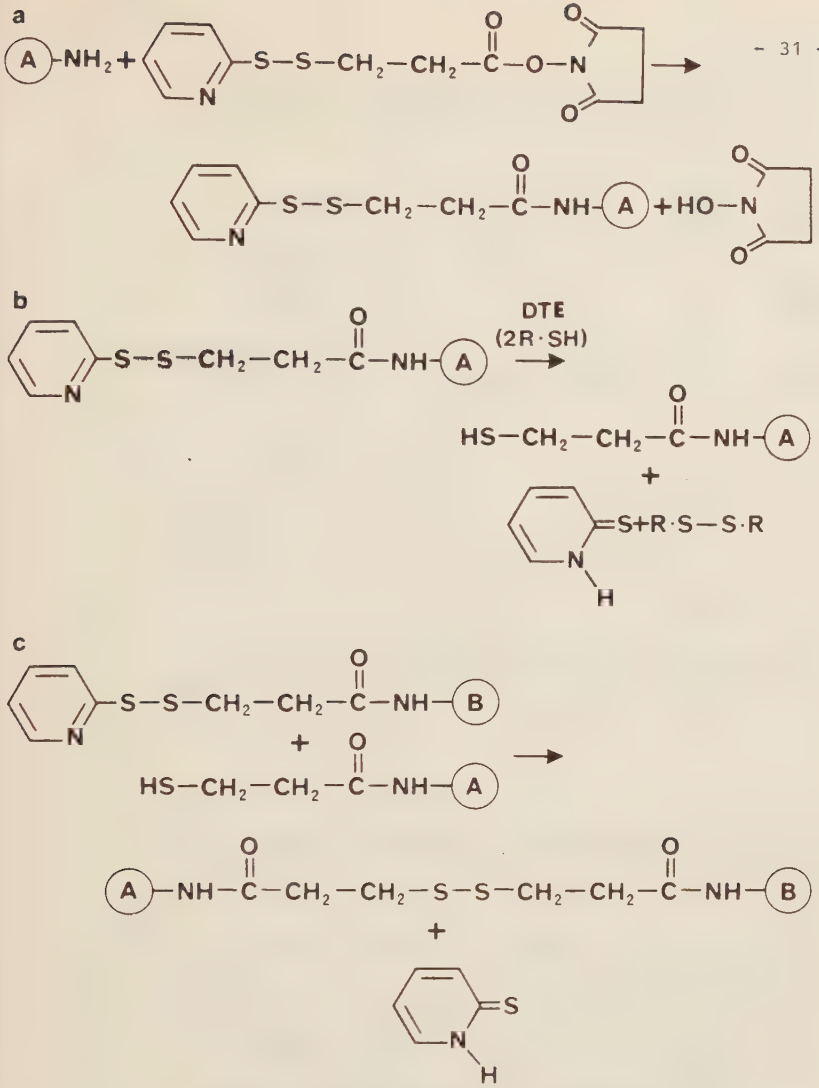
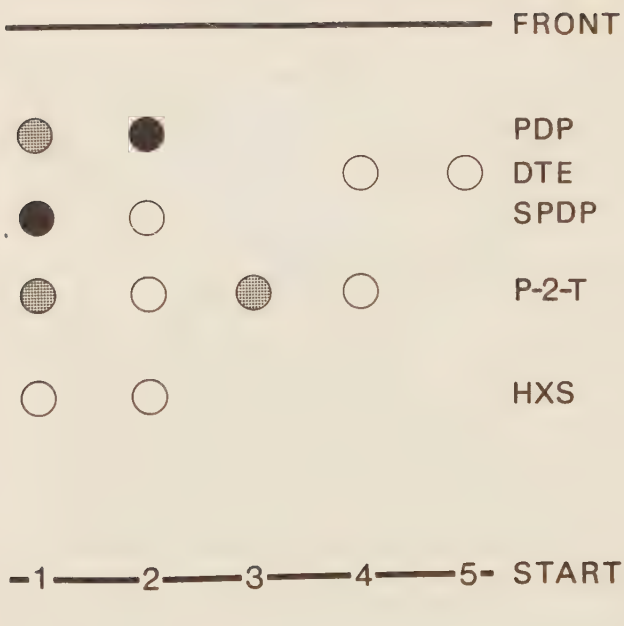


Abb. 12 Steuerung des Reaktionsablaufes bei Protein-Protein Kopplung mit dem heterobifunktionellen Reagenz SPDP

a Aminolyse des Succinimidylesters

b Abspaltung von Pyridin-2-Thion

c Protein-Protein Kopplung



a

Abb. 13

Analytik der Kopplungsreaktion zwischen Proteinen und SPDP

a) Dünnschichtchromatogramm der SPDP-Spaltprodukte

1 Käufliches SPDP

2 SPDP nach Reaktion mit Ammoniak

3 Pyridindithiopropionat (PDP) nach Reduktion mit wenig DTE

4 wie (3) nach Zugabe eines Überschusses von DTE

5 Dithioerythrit (DTE)

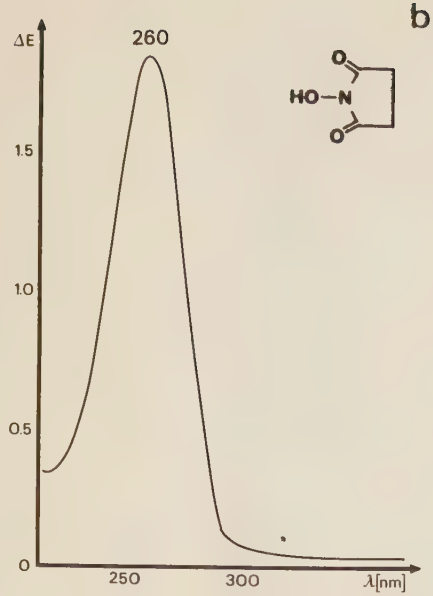
Dünnschichtchromatogramm an Kieselgel GF_{254} mit Butanol-Eisessig-Wasser 8:1:1

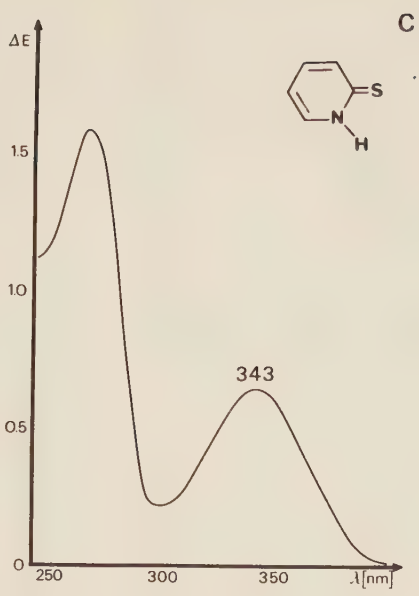
Absorptionsspektren von

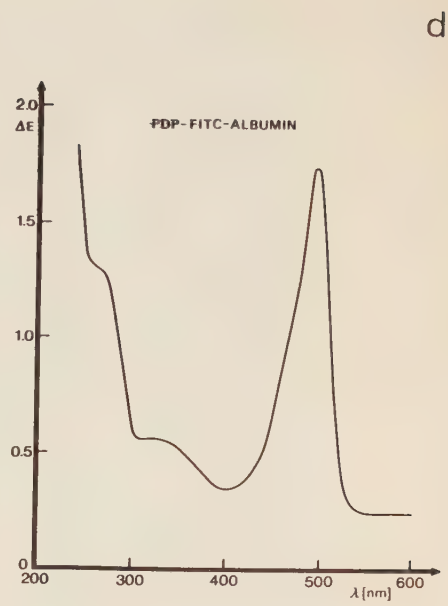
b) N-Hydroxy-Succinimid

c) Pyridin-2-thion

d) FITC-PDP-Albumin


b
ΔE
260
1.5
1.0
0.5
0
250
300
λ[nm]
HO–N
O
O


c
ΔE
1.5
1.0
0.5
0
343
250
300
350
λ[nm]
S
N
H


d
2.0
ΔE
PDP-FITC-ALBUMIN
1.5
1.0
0.5
0
200
300
400
500
600
λ[nm]

Zusätzlich ist der Erfolg des Reduktionsschrittes am ersten Kopplungspartner auf einfache Weise mit DTNB durch die Absorptionszunahme bei 412 nm bestimmbar (21), insbesondere die Erhaltung der SH-Gruppen nach Ablauf der Gelfiltration. Tab. 4 zeigt die zur Beschreibung der Kopplungsreaktion notwendigen Daten.

Tab. 4: Analytische Daten für Kopplungsreaktionen mit SPDP

Substanz	Wellenlänge (nm)	Extinktionskoeffizient ($Mol^{-1}cm^{-1}$)
Protein (nach BRADFORD, Seite 18)	595	gemäß Eichkurve (Seite 2o)
FITC-Substitution	495	70 000
Freies SH (über DTNB)	412	13 600
Pyridin-2-thion	343	8 080
N-Hydroxy-Succinimid	260	8 200

3.5 Kopplung von FITC-Albumin mit SPDP

Nachdem es gelungen war, FITC-Albumine zu erhalten, die bei der Gelfiltration keine unspezifische Adsorption an das Säulenmaterial zeigten, wurden in einer größeren Versuchsreihe FITC-Albumine unterschiedlichen Substitutionsgrades mit unterschiedlichem Überschuß an SPDP zur Reaktion gebracht (siehe Abb. 13d). Die experimentelle Technik entsprach im wesentlichen CARLSSON et al. (10) und wurde zunächst in kleinen Ansatzvolumina durchgeführt.

In einem typischen Experiment wurden 2 ml FITC-Albumin (F/P_{molar} = 12; 10 mg Protein/ml ≙ 286 nMol/Ansatz) in 0.1 M NaCl - 0.1 M Phosphat-Puffer, pH 7.5, mit 150 µl einer alkoholischen SPDP-Lösung (13 mM ≙ 1950 nMol SPDP/Ansatz) unter starkem Rühren versetzt. Dies entspricht einem 6.8-fachen molaren Überschuß an Reagenz. Nach 30 Minuten Reaktionszeit wurde das Gemisch kurz an der Wasserstrahlpumpe entgast und mittels Gelfiltration an Sephadex G 25 (Säule 1.5 x 30 cm) aufgetrennt. Der Frontpeak (PDP-FITC-Albumin) wurde isoliert und eingeengt (siehe Abb.14a). Der Substitutionsgrad wurde an einer kleinen Probe durch Thiolyse mit Dithioerythrit (20 mM DTE) bestimmt, die zugehörige Proteinmenge und die Substitution mit FITC gemäß Tab. 3.

Zur Kontrolle wurde auch nicht mit FITC substituiertes Humanalbumin in die Versuche miteinbezogen. Die letzte Spalte der Tabelle 3 zeigt deutlich, daß der erreichte Substitutionsgrad an PDP im Verhältnis zum vorgegebenen molaren Überschuß deutlich vom Substitutionsgrad mit FITC abhängt, was sich in einfacher Weise dadurch erklärt, daß beide Substituenten um die ε-Aminogruppen des Lysins konkurrieren. Insgesamt erreicht man mit beiden Substituenten etwa 30 der 56 ε-Aminogruppen des Humanserumalbumins, wobei bemerkenswerterweise die zusätzliche Substitution mit PDP die Löslichkeit des Trägermoleküls im Gegensatz zum FITC kaum beeinflußt.

Aufgrund dieser Vorexperimente war es möglich, größere Mengen von PDP-FITC-Humanalbumin gezielt zum Zwecke einer Kopplung mit PDP-IgG-Präparaten zu präparieren. Die Präparate wurden nach der Gelfiltration rekonzentriert und tiefgefroren.

3.6 Substitution von Antikörpern mit SPDP

Nach einem ganz ähnlichen Vorgehen, wie für die Substitution von FITC-Albuminen geschildert, wurden IgG-Fraktionen von Antiseren mit SPDP zur Reaktion gebracht.

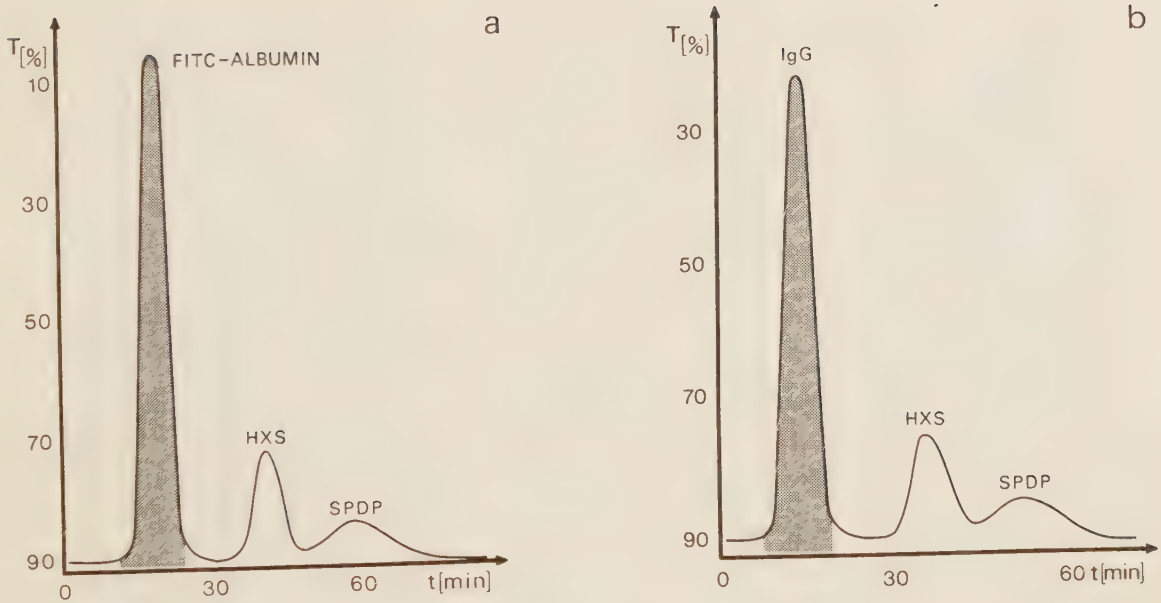


Abb. 14 a+b Isolierung von PDP-markierten Proteinen aus dem Reaktionsansatz durch Gelfiltrationschromatographie an SG 25.

a: PDP-FITC-Albumin b: PDP-IgG

Alle Antikörper stammten vom Kaninchen und hatten die Spezifitäten:

anti-Human IgG
anti-Ratten IgG
anti-Meerschweinchen IgG

Spezielle Aufmerksamkeit galt bei diesen Versuchen der Frage, inwieweit man einen Antikörper mit SPDP beladen kann, ohne seine Immunreaktion wesentlich zu vermindern. Die Erhaltung enzymatischer und immunologischer Reaktivitäten scheint in der Literatur nie wirklich systematisch untersucht worden zu sein. Lediglich in der Arbeit von AVRAMEAS (2) wird geschildert, daß die Substitution von ε-Aminogruppen des Lysins durch Glutaraldehyd die enzymatischen Aktivitäten nahezu unbeeinflußt läßt. In der mehrfach zitierten Arbeit von CARLSSON et al. (10) findet sich für die Kopplung zwischen Antikörpern und verschiedenen Enzymen keine quantitative Angabe über Aktivitätserhaltung in Abhängigkeit vom Kopplungsgrad; für den Zweck dieser Arbeit erschien dies aber außerordentlich wichtig.

Für eine erste Prüfung wurde anti-Human IgG mit verschiedenen molaren Überschüssen an SPDP für 30 Minuten versetzt. Das Verfahren entsprach im wesentlichen dem auf S. 35 dargestellten; das Ansatzvolumen war jedoch auf 1/10 reduziert. Die nach der Gelfiltration an Sephadex G 25 erhaltenen hochmolekularen Fraktionen (Abb. 14b) wurden rekonzentriert und bei gleicher Proteinkonzentration im Ouchterlony-Immundiffusionstest eingesetzt (Abb. 15). Als Maß für die Immunreaktivität der Produkte galt dann der Abstand des Immunpräzipitats von der Auftragstelle für den Antikörper, im Vergleich zum Abstand des Präzipitats von der Auftragstelle für das nichtsubstituierte IgG (26).

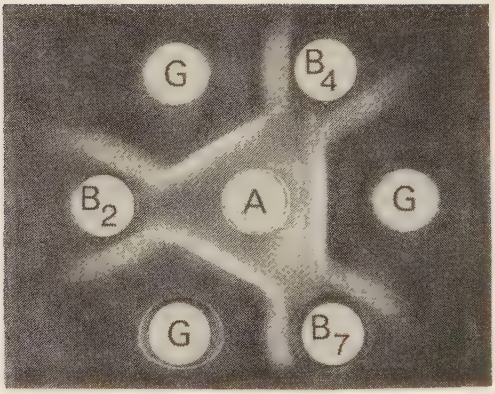


Abb. 15

Erhaltung der Aktivität von anti human-IgG nach Reaktion mit unterschiedlichen Mengen an SPDP.

Ouchterlony-Diffusionstest in 1.2% Agarose, 20 mM Pyrophosphat pH 8

A unbehandelter Antikörper

$B_{(2,4,7)}$ Antikörper nach Substitution mit 2,4, und 7 Mol PDP pro Mol Protein

G Human-IgG

Tabelle 5: Reaktion von anti-Human-IgG mit unterschiedlichen Konzentrationen an SPDP (Methode siehe S. 35). Auch höher substituiertes PDP-anti-Human-IgG behält seine immunologische Aktivität.

Vorgegebener molarer SPDP-Überschuß	Erreichter Substitutionsgrad		Immunologische Aktivität des Reaktionsproduktes (siehe Abb. 15)
	PDP Mol/ IgG Mol	% des vorgegebenen SPDP-Überschusses	
4.3	3.1	72	+
7.0	5.0	71	+
8.0	5.6	70	+
10.0	7.2	72	+

Erreicht wurde bei einem 10-fachen molaren Überschuß an SPDP eine PDP-Ankopplung von 7.2 Mol/Mol IgG, wobei das Reaktionsprodukt nahezu vollständig immunologisch aktiv blieb. Die Reaktionsprodukte wurden unter 10 mM NaN_3 über mehrere Tage bei $0^{\circ}C$ im Kühlschrank aufbewahrt (Tab. 5, Abb. 15).

3.7 Reduktion des PDP-FITC-Albumins mit Dithioerythrit; Erhaltung der Mercaptopropylgruppierung

Die Reduktion von PDP-FITC-Albumin in 25 mM Dithioerythrit führt zunächst zur Freisetzung von Pyridin-2-thion, womit die Ausgangsmenge an freigelegten Mercaptopropylgruppen über die Extinktionsänderung bei 343 nm bestimmt werden kann. Bei der nachfolgenden Gelfiltration sahen wir dann, daß ein erheblicher Prozentsatz dieser Gruppen bei Abtrennung von Dithioerythrit reoxydiert wird. So waren bei einem typischen Experiment, ausgehend von 3 Sulfhydrylgruppen pro Mol Mercaptopropyl-FITC-Albumin nach der Gelfiltration im Mittel nur noch 1,2 Sulfhydrylgruppen/Mol Protein nachweisbar. Daraufhin wurde besonders bei diesem Trennungsschritt mit sorgfältig entgasten und z.T. mit stickstoffgesättigten Puffern gearbeitet, um diesen Oxydationsverlust gering zu halten. Im Ergebnis zeigte die Bestimmung der freien SH-Gruppen nach der Gelfiltration unter diesen Bedingungen bei Bestimmung mit DTNB eine Erhaltung von etwa 60% der Mercaptopropylgruppen. Die entsprechende Gelfiltration zeigt Abb. 16.

3.8 Bildung des Heterokonjugats

Für das weitere Vorgehen ergab sich aus dem Vorhergesagten folgende Strategie:

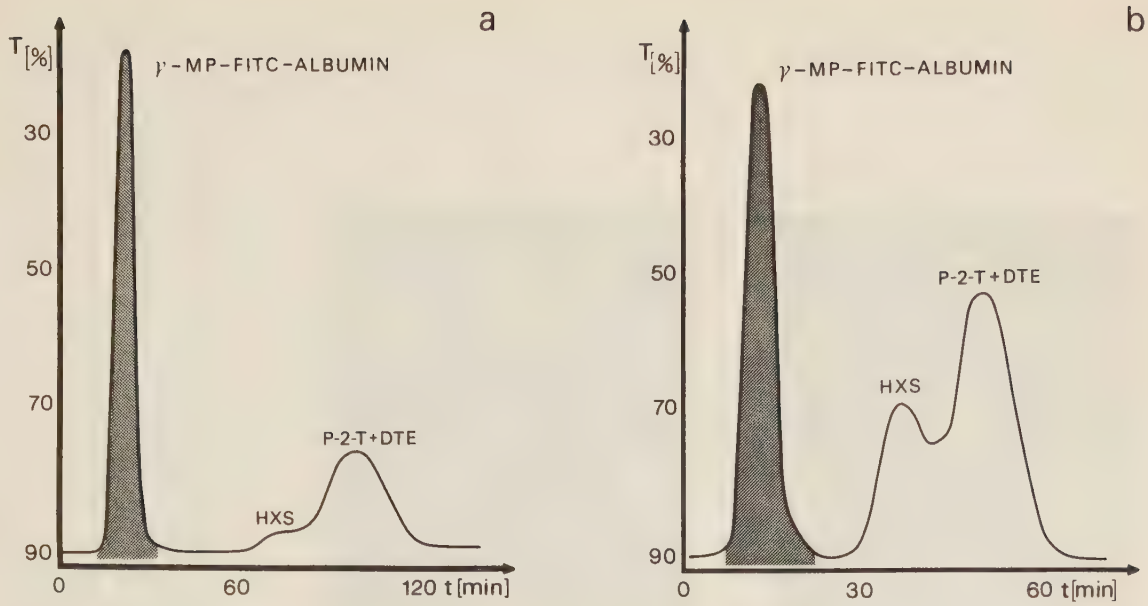
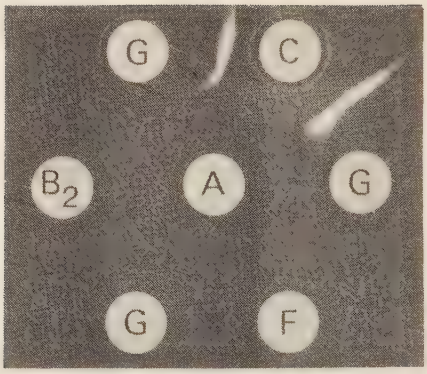


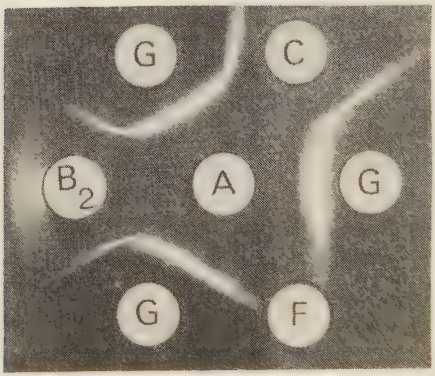
Abb. 16 Isolierung von Mercaptopropyl-FITC-Albumin durch Gelfiltration an SG 25

a Reduktion des PDP-FITC-Albumins (DTE) nach seiner vorherigen Abtrennung aus dem Reaktionsansatz (vergl. Abb. 14).

b Reduktion des PDP-FITC-Albumins (DTE) ohne vorherige Abtrennung aus dem Reaktionsansatz.



a



b

Abb. 17
Beweis für die Reaktionsfähigkeit eines Konjugates aus FITC-Albumin und anti human IgG.
Methode und Zeichenerklärung s. Abb.15; zusätzlich:

C Konjugat
F FITC-Albumin
a) Photo der Testplatte bei Fluoreszenzanregung im UV (254 nm); Kantenfilter 4oo nm
b) Testplatte nach Färbung mit Coomassie-Blue

Für eine vorgegebene Menge PDP-Globulin wird ein Überschuß an Mercaptopropyl-FITC-Albumin derart präpariert, daß unmittelbar nach der Gelfiltration nur wenig mehr als eine Mercaptopropylgruppe zur Verfügung steht, um Kreuzvernetzungen über den Fluoreszenzträger zu vermeiden, und im übrigen die maximal mögliche Menge FITC-Albumin an den Antikörper zu binden. Das Mercaptopropyl-FITC-Albumin wird unmittelbar nach der Elution von einer Sephadex G 25-Säule und nach Entnahme einer kleinen Probe für analytische Zwecke dem PDP-IgG zugesetzt und 18 - 20 Stunden unter Stickstoff bei Zimmertemperatur gerührt.

Unter diesen Bedingungen ließ sich die Bildung fluoreszenzmarkierter immunreaktiver Heterokonjugate im Ouchterlonytest einwandfrei nachweisen, wie Abb. 17 zeigt (zur Methodik s. Abbildungslegende).

3.9 Abtrennung des Heterokonjugates

Wie bereits unter 3.2 geschildert, bereitet die Abtrennung von FITC-substituierten Proteinen an Ionenaustauschern generell erhebliche Schwierigkeiten. Immerhin waren wir durch die vorherigen Auftrennungen der für die Substitution benötigten FITC-Albumin-Fraktion an Cytodex I jetzt in der Lage, auf einfache Weise zunächst den freien Globulinanteil des Reaktionsgemisches durch Chromatographie im Reaktionspuffer an Cytodex I zu eliminieren. Das freie PDP-IgG erscheint hier als 1. Fraktion im Startpuffer und ist trotz des verwendeten erheblichen Überschusses an Mercaptopropyl-FITC-Albumin immer noch in größerer Menge im Reaktionsansatz vorhanden. Durch Erhöhung der NaCl-Konzentration im Elutionspuffer auf 2 M ließ sich dann ein Gemisch aus FITC-Albumin

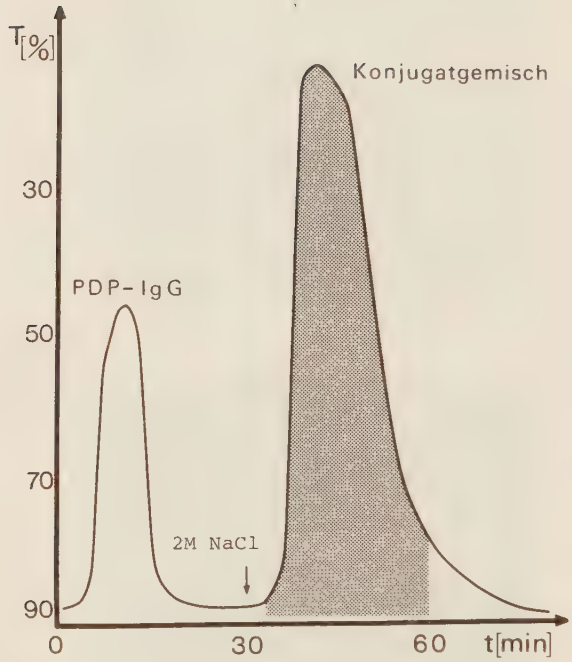


Abb. 18 Abtrennung von überschüssigem PDP-IgG aus dem Reaktionsansatz durch Ionenaustauschchromatographie an Cytodex 1.
Konjugatgemisch: Überschüssiges FITC-Albumin und Heterokonjugate (vergl. Abb. 19).

und Heterokonjugat von der Cytodex-Säule eluieren (Abb. 18). Mehrere Versuche, bereits mit diesem Chromatographie-Schritt eine Trennung zwischen FITC-Albumin und dem Heterokonjugat zu erreichen, schlugen fehl. Es sollte aber der große Unterschied im Molekulargewicht zwischen freiem FITC-Albumin und dem Konjugat eine Trennung im Wege der Gelfiltration ermöglichen. Eine größere Zahl von Experimenten mit Ionenaustauschern und Gelfiltrationsmedien blieb zunächst erfolglos. Ungeeignet für diesen Zweck sind insbesondere:

	Zahl der Versuche
DEAE-Sephacel	11
QAE-Sephadex A 50	2
CM-Sephadex C 50	1
Ultrogel AK 34	3
Sepharose 4 B	3

Erst die Neueinführung des Gelfilters Sephacryl 200 ergab in mehreren Experimenten eine sehr gute Auftrennung, wobei sich eine Heterogenität des Konjugats herausstellte (Abb. 19).

Eine weitere große Zahl von Versuchen, FITC-Albumin und das Heterokonjugat durch Immunadsorptionschromatographie an CNBr-Sepharose-immobilisiertem Antigen (IgG) aufzutrennen (17), schlug ebenfalls fehl. Das Konjugat wurde zwar an die Säule adsorbiert, ließ sich aber weder durch hochkonzentrierte Puffer mit chaotropen Anionen (3 M Kaliumjodid, 4 M Natriumrhodanid) noch durch pH-Änderungen (2 M Glycin-HCl-Puffer pH 2.4) wieder aus der Säule eluieren.

Die IgG-Bindung an CNBr-aktivierte Sepharose ließ sich sehr einfach mit dem Protein-Reagenz nach BRADFORD (6) nachweisen. Offenbar war aber in unseren Präparaten die Besetzungsdichte mit IgG so hoch, daß das Heterokonjugat auf der Säule präzipitierte und der Antigen-Antikörper-Komplex nicht mehr zu lösen war, was auch in der Literatur geschildert wird (3,20).

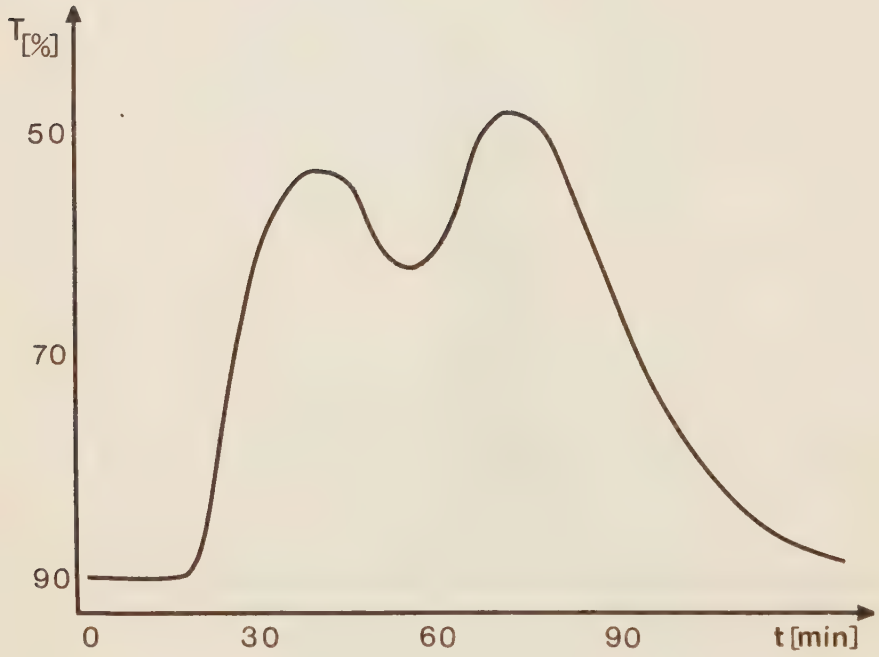


Abb. 19 Gelfiltration eines Heterokonjugatgemisches von unterschiedlich hoch mit FITC-Albumin substituiertem anti-Human-IgG an Sephacryl 200.
Die Albuminfraktion folgt erst bei 200 min in sehr geringer Konzentration.
Säule: 15 x 300 mm in 0.1 M NaCl - 0.1 M Na_2HPO_4, pH 7.5.

Nach der Rekonzentrierung des Eluats aus der Chromatographie an Sephacryl 200 ließ sich die Immunaktivität des Konjugats im Ouchterlony-Immundiffusionstest einwandfrei nachweisen. (Abb. 17)

3.10 Heterogenität der Konjugate

Für die Bereitung von immunaktiven Konjugaten waren wir schon aus Kostengründen darauf angewiesen, in sehr kleinen Ansätzen zu arbeiten, die dann eine ausführliche Modellanalyse eventueller Inhomogenitäten nahezu ausschlossen.

Um wenigstens im Modellversuch zu überprüfen, worauf die bei der Filtration an Sephacryl S 200 gefundenen Inhomogenitäten beruhen könnten, wurde in einem erheblich großen Versuchsansatz ein Heterokonjugat aus 60 mg MP-FITC-Albumin und 25 mg gereinigtem IgG aus Ratten-Ascites nach Kopplung mit SPDP dargestellt. Der Substitutionsgrad F/P für das FITC-Albumin betrug 8, das molare Verhältnis der Reaktanden im Ansatz 6. Der Gehalt an freien SH-Gruppen im MP-Albumin nach der Reduktion war 1.2 Mol/Mol, der PDP-Gehalt des IgG 9.6 Mol/Mol. Die Isolierung des Konjugats nach 20 h Reaktionszeit erfolgte, wie geschildert, an Cytodex 1 mit einem steilen NaCl-Gradienten, nachdem zuvor ein Doppelpeak von freiem IgG im Reaktionspuffer eluiert worden war. Von sämtlichen relevanten Fraktionen wurden Absorptionsspektren aufgenommen und aus den Spektraldaten folgende Berechnung in Anlehnung an das Vorgehen von v. MAYERSBACH u. MITRENGA(zit. nach (1)) ausgeführt:

(1) Extinktionsanteil des Globulins bei 278 nm

$$E^{G}_{278} = E_{278} - f \times E_{496}$$

f entspricht dem Extinktionsanteil des FITC-Albumins und war in diesem Versuch für FITC-Albumin f= 0.53, für MP-FITC-Albumin und PDP-FITC-Albumin f = 0.51, für MP-FITC-Albumin in Gegenwart von DTE f = 0.56.

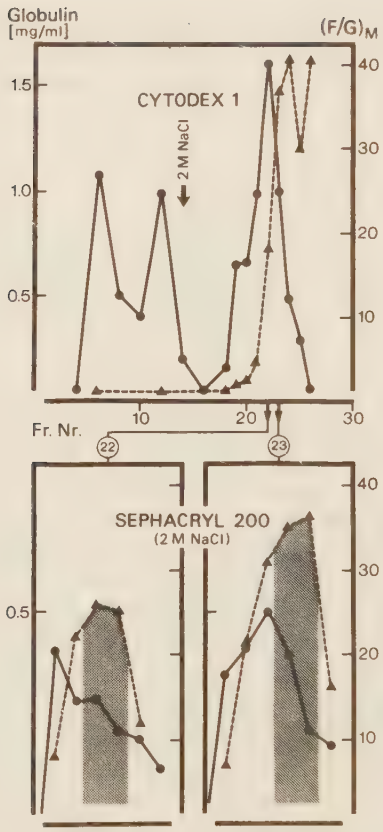


Abb. 20 Reaktionsansatz zur Kopplung von FITC-Albumin und IgG aus Rattenascites gemäß Textbeschreibung S.49.

Ionenaustauscherchromatographie an Cytodex 1 kombiniert mit Gelfiltration an Sephacryl 200 (vergl. hierzu Abb. 18 und 19).

Globulin: ●——————●

$(F/G)_M$: ●– – – – – –●

(2) Konzentration des Konjugats, bezogen auf den Globulinanteil

$$[G] = E^{G}_{278} \times \alpha \ [mg/ml]$$

wobei α für jedes Globulin gesondert bestimmt werden muß. Für das verwendete Ratten-Ascites-Globulin war $\alpha = 1.49$.

(3) Molares Verhältnis $(F/G)_M$ aus den reziproken Extinktionskoeffizienten und den Extinktionen bei 496 und 278 nm (s.a. Tab. 4) :

$$\frac{E_{496}}{E^{G}_{278}} \times \frac{14.3 \times 10^{-6}}{6.1 \times 10^{-6}} = \frac{E_{496}}{E^{G}_{278}} \times 2.33$$

Der obere Teil der Abbildung 20 zeigt das Ergebnis der Ionenaustausch-Chromatographie, bei der bereits erhebliche Inhomogenitäten in den FITC-haltigen Fraktionen evident werden. Zwei dieser Fraktionen wurden weiter an Sephacryl S 200 mit sehr geringer Fließgeschwindigkeit der Gelfiltration unterzogen. Das Ergebnis zeigt der untere Teil der Abbildung 20. Trotz erheblichen Unterschieden in der Markierungsdichte treten hier immerhin aufeinanderfolgende Fraktionen mit nahezu gleichem Markierungsverhältnis $(F/G)_M$ auf, die vorbehaltlich weiterer Nachprüfung als homogen angenommen werden dürfen.

Selbstverständlich weist das oben angegebene Berechnungsverfahren wegen Differenz- und Quotientenbildung ganz erhebliche Fehler auf, insbesondere dann, wenn die absolute Konzentration des Globulinanteils bei hoher Markierungsdichte klein wird. Das wird sich nur durch Direktmarkierung des Globulins mit Radioisotopen (18) und damit einer direkten Messung des Globulinanteils umgehen lassen.

Insgesamt beweist dieser Versuch, daß eine gewisse Homogenität durch Kombination von Ionenaustausch-Chromatographie und Gelfiltration zu erreichen ist, wobei aber immer lediglich 1/4 - 1/3 der in einer Ionenaustauschfraktion enthaltenen Konjugate im folgenden Schritt homogen erhalten werden.

4. DISKUSSION

Die in Tab. 1 zusammengefaßte Auswahl erster Arbeiten zur quantitativen Bestimmung wichtiger Serumproteine und niedermolekularer Haptene mit Hilfe von Fluoreszenzimmunoassays (FIA) haben eindeutig gezeigt, daß die Nachweisempfindlichkeit dieser Methode unter Umständen bis in den Bereich gängiger Radioimmunoassays heranreichen kann. Unsere eigenen Voruntersuchungen an Autoantikörpern gegen Proteine des Aktomyosins aus menschlichem Herz- und Skelettmuskel (43), sowie ein Methodenvergleich zur Bestimmung des IgE in Humanseren (nicht veröffentlicht) haben aber auch die Störanfälligkeit dieser Methode in niedrigen Konzentrationsbereichen abermals bewiesen (9,18,49). Diese Nachteile lassen sich mit konventionell niedrig fluoreszenzmarkierten Antikörpern nicht ausgleichen, so wünschenswert es wäre, einen Fluorimmunoassay alternativ zur RIA- und ELISA-Methodik zur Verfügung zu haben. Eine Verbesserung des peak-background-Verhältnisses läßt sich nur durch Erhöhung der Markierungsdichte erreichen, wobei die Aktivität des Antikörpers erhalten bleiben muß (12,57).

Die einzig mögliche Konsequenz aus unseren sehr zeitaufwendigen und umfänglichen Voruntersuchungen, die hier nur andeutungsweise geschildert wurden, war es, eine Methodik zu finden, die in Zukunft zu hochfluoreszenzmarkierten Primärantikörpern führt, wobei mindestens das 10-20 fache der bisherigen molaren Verhältnisse zwischen Fluoreszenzmarker und markiertem Protein anzustreben war. Das Ziel der Untersuchungen war weiter, eine solche fluoreszenzmarkierte Verbindung soweit zu reinigen, daß spätere Untersuchungen über das spezifische Reaktions- und das unspezifische Adsorptionsverhalten möglich werden.

Sowohl ARNOLD (1), als vor allem auch KELLER (32), betonen mit besonderem Nachdruck, daß sowohl für analytische, als auch histochemische Anwendung nur monospezifische und homogen fluoreszenzmarkierte Antikörper verwandt werden sollten. Aufgrund der Vorreinigung gilt dies auch für das Konjugat aus hochfluoreszenzmarkiertem Albumin mit anti-human-IgG, das wir unter Verwendung des heterobifunktionellen Reagenz SPDP präpariert haben.

Als meist verwendete Fluoreszenzmarker werden in der Literatur FITC und TRITC angegeben, weiter dann Dansylchlorid, Stilbenderivate und gelegentlich Akridinderivate (siehe Abb. 7). Für die Markierung von Proteinmolekülen sind im wesentlichen die ersten drei genannten Farbstoffe verwendet worden. Wir haben uns zunächst auf das FITC beschränkt.

Fluoresceinisothiocyanat und das heterofunktionelle Reagenz SPDP reagieren beide mit den ε-Aminogruppen des Lysins (10, 31), wie bereits aus der Konkurrenz der Substituenten beim Albumin ersichtlich wird (Tab. 3). Bemerkenswert ist, daß ohne weitere Vorbehandlung wesentlich weniger Lysinreste einer Substitution mit FITC als einer Substitution mit SPDP zugänglich sind. Das läßt zunächst die Frage offen, ob nur oberflächliche oder auch tiefer in der Tertiärstruktur des Albumins liegende Lysinreste durch SPDP substituiert werden. Dann nämlich bleibt offen, inwieweit Kopplungen mit Mercaptopropylverbindungen an diesen substituierten Lysinresten, sofern sie im Inneren des Albuminmoleküls liegen, überhaupt stattfinden. Die Antwort auf diese Frage muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Bei der Substitution von Antikörpern dürfte eine ganz ähnliche Situation vorliegen. Die Befunde zeigen aber eindeutig, daß FITC Antikörper inaktiviert, während SPDP auch bei relativ

hoher Besetzungsdichte die biologische Aktivität von Antikörpern kaum beeinträchtigt. Das bestätigt nicht nur die von AVRAMEAS (3) diskutierte Ansicht, daß Lysin selten in der aktiven Region von Antikörpern funktionell beteiligt ist, sondern führt zu der Überlegung, daß offenbar die generalisierte Negativierung eines IgG-Moleküls über FITC zu Strukturänderungen führt, die die Immunaktivität herabsetzen oder aufheben. Solange dies, wie im Falle des SPDP, nicht geschieht, bleibt das IgG-Molekül immunaktiv.

Als Fluoreszenzträger kam für uns ein Protein in Frage, das deutlich mehr Lysinreste enthält, als das von SHECHTER et al. (56) für Hormonmarkierungen verwendete Laktalbumin, und im Molekulargewicht deutlich verschieden von IgG-Molekülen war, da bereits der Versuch, fluorochromierte IgG-Antikörper durch Immunabsorptionschromatographie zu reinigen, wegen geringer Ausbeute und Inaktivierung des Antikörpers von ARNOLD (1) mit großer Skepsis beurteilt wird und im Rahmen dieser Arbeit trotz großer Anstrengungen mißlang. Als geeignetes Molekül bot sich daher das Humanserumalbumin an, welches mit einem Molekulargewicht von 68 000 zwar schon relativ groß war, sich jedoch gut in vielen Lösungsmitteln lösen läßt, mit 56 Molen Lysin pro Mol Albumin eine ausreichende Anzahl von ε-Aminogruppen zur Verfügung stellt (55) und auch in den übrigen Daten den Anforderungen gerecht wurde. In Gegenwart von Serum ist für dieses Molekül zudem eine geringe unspezifische Adsorption zu erwarten, auch dann, wenn es mit FITC markiert ist (35).

Die Kopplung von Albumin als Fluoreszenzträger wurde erheblich verbessert durch reversible Denaturierung mittels Triton X 100, SDS oder Guanidinhydrochlorid. Insbesondere Guanidinhydrochlorid gibt wesentlich höhere Fluoreszenzwerte als die

anderen benutzten denaturierenden Agenzien (siehe Tab. 2). Ob FITC wirklich der geeignete Fluoreszenzmarker ist, werden spätere Experimente zeigen müssen, die im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden konnten. Immerhin dürfte FITC durch seine erheblich höhere Stabilität (7) bei geeigneter Aufbewahrung die Haltbarkeit des gesamten Kopplungsproduktes so weit erhöhen, daß eine Begrenzung der Verwendbarkeit nur noch durch den langsamen Aktivitätsverlust des IgG-Moleküls gegeben ist.

Eine räumliche Trennung zwischen dem Antikörper und einem mit FITC beladenen denaturierten Protein-Fluoreszenzcarrier scheint die Funktion der aktiven Zentren des Antikörpers nahezu nicht zu beeinflussen, wie hier durch Einführung des Spacermoleküls Dithiopropionsäure gegeben. Der im Modell bestimmbare Abstand von rund 8 Å zwischen beiden Molekülen reicht offensichtlich aus, um eine Interaktion mit positiven Ladungsträgern im Immunglobulin soweit zu verhindern, daß insgesamt mehr als 24 negative Ladungen rund um das Antikörpermolekül keine wesentliche Inaktivierung des Immunglobulins bewirken. Wir glauben deshalb, daß künftige Versuche zur Substitution von Antikörpern mit FITC generell auf dem hier gezeigten Weg ausgeführt werden sollten.

Nimmt man die bisher erhaltenen maximalen Substitutionsgrade für FITC-Albumin und anti-human-IgG(rb)IgG-Fraktion zusammen, so ergibt sich eine maximal mögliche Markierungsdichte von

7 Mol PDP/Mol IgG x 30 Mol FITC/Mol Albumin

$\cong$ 210 Mol FITC/Mol IgG

Wir haben nicht versucht, derart hohe Markierungsdichten zu erreichen. Das bisherige Ergebnis einer Markierungsdichte von 20-30 Mol FITC/Mol IgG erschien ausreichend, um etwa einen Fluoro-Immuno-Assay um eine Zehnerpotenz empfindlicher zu gestalten, als dies mit konventionell markierten Antikörpern

möglich ist. Nun ist zunächst einmal das unspezifische Adsorptionsverhalten verschiedener Konjugate zu prüfen, um die Applikation derart fluoreszenzverstärkter Antikörper zu ermöglichen und dann weiter zu höheren Substitutionsgraden zu kommen. Dies lag jedoch außerhalb des zeitlichen Rahmens dieser Arbeit.

Auch der außerordentlich hohe Preis für das heterobifunktionelle Reagenz SPDP sollte nicht davon abhalten, es auch zukünftig für die Kopplung zwischen Fluoreszenzträgern und Immunglobulinen zu verwenden. Es gibt nach unserer Erkenntnis bisher kein anderes heterobifunktionelles Reagenz, das es gestattet, im analytischen wie präparativen Maßstab eine Reaktion zwischen zwei Proteinen ähnlich übersichtlich und eindeutig zu gestalten und quantitativ verfolgbar zu machen (siehe Tab. 4). Hinzu kommt der nicht-denaturierende Effekt gerade bei Antikörpern, wie bereits diskutiert. Es stellt sich zudem die Frage, bei welchen anderen Reaktionen (z.B. Kopplung von Peptidhormonen an Fluoreszenzträger) dieses Reagenz weiter angewendet werden sollte, wenn auch dort die biologische Aktivität durch SPDP nicht beeinflußt wird. Dies wird in Zukunft zu prüfen sein.

Wir haben absichtlich ein sehr einfaches und vergleichbar bekanntes Modell in Form des anti-IgG-Antikörpers gewählt, für das es eine große Zahl von Daten in der Literatur gibt (13, 14,22,25,42). Wichtig waren für uns vor allem folgende Kriterien für die Güte des Kopplungsverfahrens:

1) Es ist bisher noch niemals gelungen, Homokonjugate bei einer Protein-Protein-Kopplung völlig auszuschließen. Durch diese Untersuchungen und die von CARLSSON et al. (10) vorgelegten Daten ist es unwahrscheinlich, daß bei Verwendung von SPDP und geeigneter Sorgfalt Homokonjugate gebildet werden.

2) Es ist bisher noch nie wirklich gelungen, Heterokonjugate von den Ausgangsprodukten zu trennen (10,50). Wie wir haben zeigen können, ist dies nicht nur möglich, sondern für den Zweck dieser Arbeit sogar unerläßlich, insbesondere für Anwendungen im Fluoroimmunoassay. Die Beweisführung von SCHICK und SINGER (52) für Heterokonjugation unter Verwendung homobifunktioneller Reagenzien ist trotz aufwendiger Methodik sicher anzuzweifeln. Die Abtrennung des Heterokonjugats von den Ausgangsprodukten und immerhin möglichen Homokonjugaten sollte die Voraussetzung für künftige Versuche geben, die auch das unspezifische Adsorptionsverhalten des Heterokonjugates überprüfen. Dies war nur durch die Kombination mindestens zweier Methoden (Gelfiltration und Ionenaustauschchromatographie) möglich, wobei zum Erfolg dieser Arbeit wesentlich zwei Neueinführungen beigetragen haben:

Die Einführung (oder Wiedereinführung) niedrig substituierter DEAE-Ionenaustauscher, die es erlaubt, einerseits Immunglobuline in gewohnter Weise von anderen Serumproteinen abzutrennen und gleichzeitig den Fluoreszenzcarrier chromatographierbar zu machen, was an höher substituierten DEAE-Ionenaustauschern und einer Reihe weiterer Anionenaustauschern nicht gelingt. Weiter die Einführung des Gelfilters Sephacryl 200, das die Trennung von Komponenten extrem unterschiedlichen Molekulargewichts erlaubt. Zusammenfassend ergibt sich das Präparationsschema der Abb.21 .

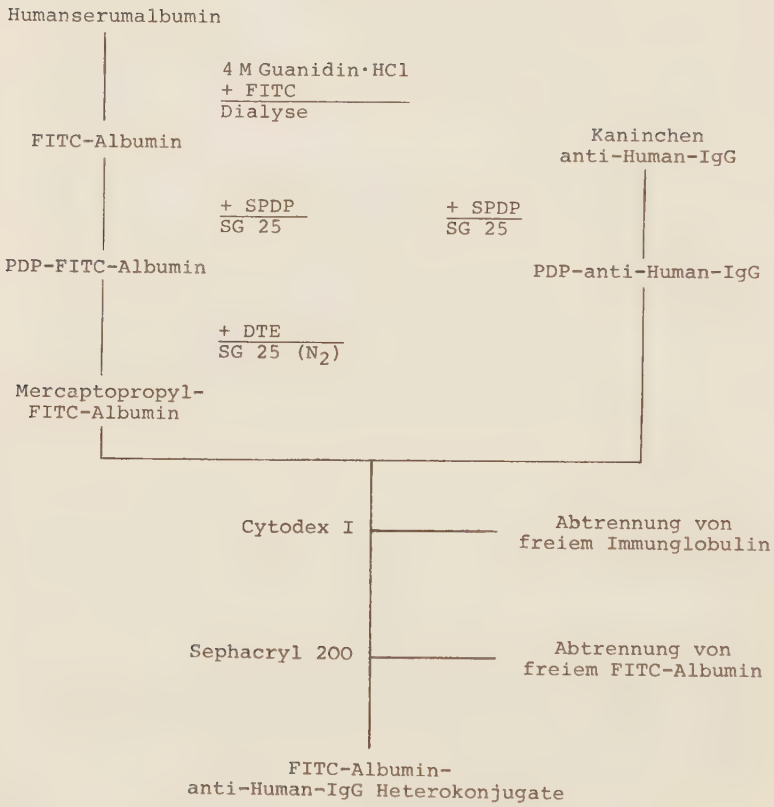


Abb. 21: Vollständiger Syntheseweg zur Darstellung eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers mit Hilfe des heterobifunktionellen Reagenz SPDP (vgl. Abb. 8).

L I T E R A T U R

1 Arnold, W. (1976): Die Anwendung der Immunfluoreszenz (fluoreszierende Antikörpertechnik) in der klinischen Immunologie. I. Erläuterung der Methodik, II. Befunde und ihre Bedeutung. Immunität und Infektion 4, 84-89 und 126-140

2 Avrameas, S. (1969): Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Immunochemistry 6, 43-52

3 Avrameas, S., Ternynck, T. (1967): Use of iodine salts in the isolation of antibodies and the dissolution of specific immune precipitates. Biochem. J. 102, 37c-39c

4 Axén, R., Porath, J., Ernback, S. (1967): Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides. Nature 214, 1302-1304

5 Belanger, L., Sylvestre, C., Dufour, D.(1973): Enzyme-linked immunoassay for alpha-fetoprotein by competitive and sandwich procedures. Clin. Chim. Acta 48, 15

6 Bradford, M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye-binding. Anal. Biochem. 72, 248

7 Brandtzaeg, P. (1973): Conjugates of immunoglobulin G with different fluorochromes. I. Characterization by anion-exchange chromatography. Scand. J. Immunol. 2, 273-290

8 Brown, M.S., Goldstein, J.L. (1979): Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3330-3337

9 Capel, P.J.A., Aalberse, R.C. (1975): A quantitative immunofluorescence method for the determination of IgE antibodies in comparison with the RAST. J. Immunol. Methods 7, 77-84

10 Carlsson, J., Drevin, H., Axén, R. (1978): Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. Biochem. J. 173, 723-737

11 Chen, J.H., Palmer, R., Tsay, V. (1980): A solid-phase immunofluorescence method (FIAX) for the determination of diphenylhydantoin in serum. Clin. Chem. 26, 1002

12 Cherry, W.B., McKinney, R.M., Emmel, V.M., Spillane, J.T., Hebert, G.A., Pittman, B. (1969): Evaluation of commercial fluorescein isothiocyanates used in fluorescent antibody studies. Stain Technology 44, 179-186

13 Coons, A.H., Creech, H.J., Jones, R.N. (1941): Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (N.Y.) 47, 200-202

14 Coons, A.H., Creech, H.J., Jones, R.N., Berliner, E. (1942): The demonstration of pneumococcal antigen in tissue by the use of fluorescent antibody. J. Immunol. 45, 159-170

15 Coons, A.H., Kaplan, M.M. (1950): Localisation of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. J. Exper. Med. 91, 1-13

16 Cuatrecasas, P. (1970): Protein purification by affinity chromatography.
J. Biol. Chem. 245, 3059-3065

17 Cuatrecasas, P., Anfinsen, Chr.B. (1971): Affinity chromatography.
Methods in Enzymology 22, 345-378

18 Cukor, P., Woehler, M.E., Persiani, C., Fermin, A. (1976): Iodinated versus fluorescent labelling in the RAST for the determination of serum IgE levels.
J. Immunol. Methods 12, 183-192

19 Daniels, J.C., Deindörfer, F.H.: Mitteilung der Firma IDT.

20 van Eijk, H.G., van Noort, W.L. (1976): Isolation of rat transferrin using CNBr-activated Sepharose 4B.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 14, 475-478

21 Ellman, G.L. (1959): Tissue sulfhydryl groups.
Arch. Biochem. Biophys. 82, 70-77

22 Engvall, E., Perlmann, P. (1971): ELISA - quantitative assay of IgG.
Immunochemistry 8, 871-874

23 Fischer, K., Poschmann, A.: Mitteilung vom Immunologischen Kongreß Insbruck, Oktober 1979.

24 Fothergill, J.E. (1969): Properties of conjugated serum proteins.
in: Nairn, R.C. (ed.) Fluorescent Protein Tracing, 3rd ed., Livingstone, London.

25 Franz, H., Moler, J. (1980): Reinigung und Spezifitätskontrolle von markierten Antikörpern.
Acta Histochem. Suppl. XXII, 41-46

26 Götz, H. (1973): Immunologische Plasmaproteindiagnostik. Verlag W. de Gruyter, S. 1-30

27 Goldstein, G., Slirys, I.S., Chase, M.W. (1961): Studies on fluorescent antibody staining. I. Non-specific fluorescence with fluorescein-coupled sheep anti-rabbit globulins. J. Exp. Med. 114, 89-109

28 Goldstein, J.L., Anderson, R.G.W., Brown, M.S. (1979): Coated pits, coated vesicles and receptor-mediated endocytosis. Nature 279, 679-685

29 Goodman, S.L., Hodges, G.M., Trejdosiewicz, L., Livingston, D.L. (1981): Colloidal gold markers and probes for routine application in microscopy. J. Microsc. 123, 201-203

30 Hettwer, H., Janssen, H., Moser, J.G., Naurath, H.J., Servos, U., Wagner, B. (1980): Bildung von Antikörpern und histopathologischer Verlauf bei experimentellen Immunmyopathien. Verh. Anat. Ges. 73, 871-873

31 Kawamura, A. (1977): Fluorescent antibody techniques and their applications. University of Tokyo Press, University of Park Press, 2nd ed.

32 Keller, H. (1978): Enzym-Immuno-Assay. Medizinisches Laboratorium 31, 83-94

33 Kennedy, J.H., Kricka, L.J., Wilding, P. (1976): Protein-protein coupling reactions and the applications of protein conjugates. Clin. Chim. Acta 70, 1-31

34 McKinney, R.M., Spillane, J.T., Pearce, G.W. (1964): Factors affecting the rate of reaction of fluorescein isothiocyanate with serum proteins. J. Immunology 93, 232

35 McKinney, R.M., Spillane, J.T., Pearce, G.W. (1966): A simple method for determining the labelling efficiency of fluorescein isothiocyanate products.
Anal. Biochem. 14, 421-428

36 Larsson, L.D. (1979): Simultaneous ultrastructural demonstration of multiple peptides in endocrine cells by a novel immunocytochemical method.
Nature 282, 743-746

37 Laursen, R.A., Horn, M.J., Bonner, A.G. (1972): Solid-phase Edman degradation. The use of p-phenyl diisothiocyanate to attach lysine- and arginine-containing peptides to unsoluble resins.
FEBS Letters 21, 67-70

38 Lomant, A.J., Fairbanks, G. (1976): Chemical probes of extended biological structures: Synthesis and properties of the cleavable protein cross-linking reagent [^{35}S]dithiobis (succinimidyl propionate).
J. Mol. Biol. 104, 243-261

39 Maiolini, R., Masseyeff, R. (1975): A sandwich method of enzymoimmunoassay. I. Application to rat and human alpha-fetoprotein.
J. Immunolog. Methods 8, 223

40 Maisch, B., Maier, E., Berg, P.A. (1981): Nachweis von Immunkomplexen bei bakterieller Endokarditis mit einer neuen fluorometrischen Methode (FIAX).
Z. f. Kardiologie 70, 289

41 v. Mayersbach, H., Schubert, G. (1960): Immunhistologische Methoden III: Die unspezifischen Reaktionen zwischen markierten Seren und Geweben bei der immunhistologischen Technik.
Acta Histochemica 10, 44

42 Mollison, P.L. (1975): Blood tranfusion in clinical medicine. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

43 Naurath, H.J., Hettwer, H., Moser, J.G., Servos, G., Wagner, B. (1980): Qualitative und quantitative Bestimmung von Antikörpern gegen myofibrilläre Proteine.
Acta Histochemica, Suppl. XXI, 247-251

44 Naurath, H.J., Moser, J.G., Hettwer, H., Hartmann, W. (1981): Strongly fluorescent conjugates between antibodies and FITC-labelled albumin.
Acta Anat. 111, 57

45 Peters, K., Richards, F.M. (1977): Chemical cross linking: Reagents and problems in studies of membrane structure.
Ann. Rev. Biochem. 46, 523-551

46 Pharmacia AB Upsala; SPDP-heterobifunctional reagent.

47 Pittman, B., Hebert, G., Cherry, W.B., Taylor, G.C. (1967): The quantitation of non-specific staining as a guide for improvement of fluorescent antibody conjugates.
J. Immunol. 98, 1196-1203

48 Porath, J., Axén, R., Ernback, S. (1967): Chemical coupling of proteins to agarose.
Nature 215, 1491-1492

49 Pressman, D., Yagi, Y., Hiramoto, R. (1958): A comparison of fluorescein and ^{131}J labels for determining the "in vivo" localization of anti-tissue antibodies.
Int. Arch. Allergy 12, 125-136

50 Riggs, J.L., Seiwald, R.J., Burckhalter, J., Downs, C.M., Metcalf, T.G. (1958): Isothiocyanate compounds as fluorescent labelling agents for immune serum.
Amer. J. Path. 34, 1081-1097

51 Robson, J., Jincha, J., Smith, J.: Mitteilung der Firma IDT.

52 Schick, A.F., Singer, S.J. (1961): On the formation of covalent linkages between two protein molecules.
J. Biol. Chem. 236, 2477-2485

53 Schlessinger, J., Koppel, D.E., Axelrod, D., Jacobson, K., Webb, W.W., Elson, E.L. (1976): Lateral transport on cell membranes: Mobility of concanavalin A receptors on myoblasts.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2409-2413

54 Schlessinger, J., Shechter, Y., Willingham, M.S., Pastan, J. (1978): Direct visualization of binding, aggregation, and internalization of insulin and epidermal growth factor on living fibroblastic cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 2659-2663

55 Schultze, H.E., Heimburger, N., Frank, G. (1962): Die Aminosäurezusammensetzung des menschlichen Präalbumins und die des Human- und Rinderserumalbumins.
Biochem. Z. 336, 388-396

56 Shechter, Y., Schlessinger, J., Jacobs, S., Chang, K.J., Cuatrecasas, P. (1978): Fluorescent labeling of hormone receptors in viable cells: Preparation and properties of highly fluorescent derivatives of epidermal growth factor and insulin.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 2135-2139

57 Sinsheimer, J.E., Jagodic, V., Burckhalter, J.H. (1974): FITC: Improved synthesis and purity.
Anal. Biochem. 57, 227-231

58 Starr, A., Hitchings, M., Spector, S., Friedman, H. (1980): Mitteilung der Firma IDT.
Annual Meeting of the American Society for Microbiology.

59 Stevens, R., Elmendorf, D., Gourlay, M., Stroebel, E., Gaafar, H.A. (1979): Application of fluoroimmunoassay to cerebrospinal fluid immunoglobulin G and albumin.
J. Clin. Microbiol. 10, 346-350

60 Wittner, B., Maisch, B., Kochsiek, K. (1981): Quantitativer Nachweis von Antikörpern gegen kardiales Myosin mit einer neuen fluorometrischen Methode (FIAX) bei experimenteller Myokarditis.
Z. f. Kardiologie 70, 288

61 Wold, F. (1972): Bifunctional reagents.
Methods Enzymol. 25, 623-651

62 Wong, W.L., Keefe, E., Tsay, Y. (1980)
Clin. Chem. 26, 1005

63 Wood, B.T., Thompson, S.H., Goldstein, G. (1965): Fluorescent antibody staining. III. Preparation of FITC-antibodies.
J. Immunol. 95, 225-229

64 Yalow, R.S. (1979): Radioimmunoassay.
Naturwissenschaftl. Rundschau 32, 217-224

65 Yalow, R., Berson, S. (1959): Assay of plasma insulin in human subject by immunological methods.
Nature 184, 1648

66 Zahn, H. (1964)
6th Internat. Congr. Biochem., Abstract, 135-136

Tabellarischer Lebenslauf

Name:	Naurath, Hans-Joachim
geb.:	12. März 1955 in Wuppertal-Elberfeld
Religion:	r.-katholisch
Familienstand:	ledig
Eltern:	Karl-Heinz Naurath, Beruf: leitender Angestellter Ingeborg Naurath, geb. Grosch
Einschulung:	April 1961 in die Grundschule an der Simonsstraße, Wuppertal- Elberfeld
Schulwechsel:	April 1966 auf das Staatliche Naturwissenschaftliche Gymnasium an der Bayreutherstraße, Wuppertal-Elberfeld
Schulabschluß:	Abitur am 11. Juni 1974
Studienfächer:	Wintersemester 1974 - Wintersemester 1976 Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum Sommersemester 1977 - Sommersemester 1982 Studium der Medizin an der Universität Düsseldorf
Beruf:	Assistenzarzt an den Kliniken St. Antonius in Wuppertal
Wohnsitz:	Funckstraße 55 in 56 Wuppertal 1

FOTODRUCK J. MAINZ GmbH
Neupforte 13, Nähe Markt, D-5100 Aachen
Telefon: (0241) 27305 und (0241) 38606